

**Funktionalisierte Calciumphosphat-
Nanopartikel als Instrument zum Eingriff in
die Proteinbiosynthese und deren
therapeutische Anwendung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

M.Sc. Bernhard Neuhaus

geboren in Lüdenscheid

Institut für Anorganische Chemie
der Universität Duisburg-Essen

2015

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2012 bis November 2015 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Erstgutachter:	Prof. Dr. Matthias Epple
Zweitgutachterin:	Prof. Dr. Astrid Maria Westendorf
Vorsitzender:	Prof. Dr. Maik Walpuski
Tag der Disputation:	14.03.2016

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Kolloidale Systeme	3
1.1.1 Einteilung kolloidaler Systeme	4
1.1.2 Kolloidchemische Grundlagen	5
1.1.3 Calciumphosphat-Nanopartikel	11
1.2 Biologischer Hintergrund	15
1.2.1 Genvektoren	16
1.2.2 Endozytose	17
1.2.3 Intrazellulärer Transport	20
1.2.4 Transfektion	22
1.2.5 Genstummschaltung	25
1.2.6 Darm	28
1.3 Galenik	30
2 Ziel der Arbeit	32
3 Ergebnisse und Diskussion	33
3.1 Transfektion mit funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln	33
3.1.1 Charakterisierung der Nanopartikel	33
3.1.2 Klassifizierung der verwendeten Zellen	39
3.1.3 Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln in verschiedene Zellen	40
3.1.4 Transfektion <i>in vitro</i>	43
3.1.5 Transfektion <i>in vivo</i>	56
3.1.6 Zusammenfassung	61
3.2 Genstummschaltung mit funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln	63
3.2.1 Charakterisierung der Nanopartikel	64

3.2.2 Stummschaltung von eGFP in HeLa-eGFP-Zellen.....	69
3.2.3 Aufnahme der Partikel in Mode-K-Zellen	78
3.2.4 Stummschaltung von TNF- α in Mode-K-Zellen	82
3.2.5 Genstummschaltung <i>in vivo</i>	86
3.2.6 Zusammenfassung.....	91
3.3 Strategien zum Transport von Nanopartikeln in den Darm	93
3.3.1 Charakterisierung der Transportvehikel	94
3.3.2 Kolloidchemische Untersuchung der Partikelfreisetzung aus der Gelatine kapsel	100
3.3.3 <i>In vitro</i> Untersuchungen der Transportvehikel.....	103
3.3.4 Untersuchung der Interaktion zwischen Eudragit® und Partikeln	112
3.3.5 Zusammenfassung.....	117
4 Zusammenfassung.....	118
5 Material und Methoden	121
5.1 Kolloidchemische Methoden	122
5.1.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotenzial	122
5.1.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	124
5.1.3 UV/Vis-Spektrometrie.....	126
5.1.4 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	127
5.1.5 Gefriertrocknung	127
5.2 Zellbiologische Analysemethoden	129
5.2.1 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	129
5.2.2 Durchflusszytometrie (FACS – <i>fluorescence assisted cell sorting</i>) ...	130
5.2.3 MTT-Test.....	132
6. Experimenteller Teil	134
6.1 Synthese und Charakterisierung der Nanopartikel	134
6.1.1 Synthese der CaP-Nukleinsäure-CaP-PEI-Partikel.....	135

6.1.2 Synthese der Ca-PEI-Nukleinsäure-SiO ₂ -SH-Partikel	137
6.1.3 Synthese der CaP-Nukleinsäure-PLGA-PEI-Partikel	138
6.1.4 Synthese der CaP-Nukleinsäure-CaP-Nukleinsäure-Partikel	139
6.1.5 Ostim®-PEI-Nukleinsäure	140
6.2 Gefriertrocknung	141
6.3 Zellbiologische Experimente	142
6.3.1 Lagerung und Kultivierung der Zellen	142
6.3.2 Transfektion von Zellen	144
6.3.3 Genstummschaltung von Zellen	145
6.3.4 Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen	147
6.3.5 Fixieren und Anfärben der Zellen	147
6.3.6 qPCR	148
6.3.7 FACS (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)	151
6.3.8 MTT-Test	151
6.3.9 <i>In vivo</i> -Experimente	152
6.4 Herstellung der Transportvehikel	154
6.4.1 Befüllen und Beschichten der Kapsel	154
6.4.2 Herstellung der Zäpfchen	155
7. Quellenverzeichnis	157
8. Anhang	166
8.1 Liste der verwendete Abkürzungen	166
8.2 Liste der verwendeten Geräte	168
8.3 Liste der verwendeten Chemikalien	169
8.4 Publikationsliste	171
8.5 Lebenslauf	175
9. Eidesstattliche Erklärung	176
10. Danksagung	177

1 Einleitung

Das Einbringen von rekombinanten Nukleinsäuren in Zellen zur Behandlung von Krankheiten wird als Gentherapie bezeichnet.^{1, 2} Dies umfasst in der EU (Europäische Union) sowohl DNA- als auch RNA-basierte Strategien. Viele Krankheiten beruhen auf Fehlfunktionen von Proteinen. Diese können nicht immer durch herkömmliche Therapien behandelt werden. Die Gentherapie bietet gerade hier großes Potential, da theoretisch jedes Protein zugänglich ist. So befanden sich zwischen 1989 und 2012 weltweit etwa 1843 Gentherapeutika in klinischen Studien. In etwa 30 der Studien wurden RNAi (RNA *interference*) Strategien verfolgt.^{3, 4} 2003 wurde in China unter dem Namen *Gendicine*[®] weltweit das erste Gentherapeutikum für die Vermarktung zugelassen.^{2, 5} In der EU hingegen wurde erst 2012 unter dem Namen *Glybera*[®] das erste Gentherapeutikum zugelassen. Eine Therapie mit Glybera soll etwa 1,1 Mio. € kosten.⁶⁻⁹ Beide Gentherapeutika nutzen dabei Viren als Vektoren (*Gendicine*[®] – p53-Adenovirus; *Glybera*[®] – adeno associated virus type 1 (AAV1)). Durch die induzierte Expression von p53 wird *Gendicine*[®] zur Krebstherapie eingesetzt.⁵ *Glybera*[®] hingegen wird zur Therapie von Typ 1 Hyperlipoproteinämie verwendet. Diese Krankheit wird durch eine Mutation des Gens für Lipoproteinlipase hervorgerufen. Somit enthält der Virus auch eine funktionstüchtige Variante dieses Gen.⁶

Das Interesse an Gentherapie ist also sehr groß. Jedoch gab es neben den Erfolgen der Nukleinsäure-basierten Therapien auch viele Rückschläge. So ist das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen ohne geeignete Hilfsmittel nicht effizient möglich. Weitaus die meisten der sich in klinischen Studien befindenden Gentherapeutika verwenden für den Transport der Nukleinsäuren daher Viren. Während diese Vektoren Nukleinsäuren sehr effizient in Zellen einbringen können, können sie auch starke Nebenwirkungen hervorrufen. Dazu kommen limitierte Beladungskapazitäten und hohe Kosten.^{3, 10}

Vor allem Nanopartikel und kolloidale Dispersionen bieten hier eine Alternative für den Nukleinsäuretransport. So sind solche Systeme leicht herzustellen und mit Nukleinsäuren zu beladen. Aufgrund ihrer Größe und Oberflächenfunktionalisierung können Nanopartikel von Zellen aufgenommen

werden.^{10, 11} Außerdem bieten Nanopartikel die Möglichkeit, über *targeting* Funktionen Nukleinsäure nur in bestimmte Zellen einzubringen.

Neben anderen Materialien lässt sich auch Calciumphosphat in nanoskaligen Dimensionen stabilisieren. Die Calciumphosphat-Nanopartikel lassen sich außerdem mit Nukleinsäuren funktionalisieren und zum Transport in Zellen verwenden. Als Bestandteil von menschlichen Hartgeweben ist Calciumphosphat desweiteren biokompatibel und bietet sich daher als Genvektor an.

Zur Einführung werden in den nächsten Abschnitten zunächst die kolloidchemischen Grundlagen dargestellt, mit denen die Stabilität von kolloidalen Dispersionen beschrieben werden kann. Dabei wird auch auf das Vorkommen und die Anwendungsmöglichkeiten von Calciumphosphat-Nanopartikeln eingegangen.

Anschließend wird in die biologischen Grundlagen eingeführt. Dabei geht es um die Mechanismen, die zur Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen führen. Weiterhin werden die Grundlagen besprochen, auf denen die Beeinflussung der Proteinbiosynthese durch fremde Nukleinsäuren beruht.

Abschließend werden Möglichkeiten für den Transport von Nanopartikeln durch den Magen-Darm-Trakt umrissen.

1.1 Kolloidale Systeme

Kolloidale Systeme und Nanopartikel werden von verschiedenen Autoren unterschiedlich definiert. Laut IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) bestehen kolloidale Systeme aus dispergierten Teilchen, die in mindestens einer Richtung eine Dimension zwischen 1 nm und 1 µm haben. Dörfler bezeichnet Partikel mit Ausmaßen von ungefähr zwischen 1 nm und 500 nm als Kolloide.¹² Desweiteren zeichnen sich kolloidale Systeme dadurch aus, dass die Partikel (disperse Phase) homogen verteilt in einem Medium (kontinuierliche Phase) vorliegen und die Dispersion über einen definierten Zeitraum makroskopisch unverändert bleibt.¹²⁻¹⁴ Als Nanopartikel hingegen werden üblicherweise Partikel in einer Größenordnung von 1-100 nm bezeichnet. Im medizinischen Kontext jedoch kann die Definition eines Nanopartikels bis etwa 1000 nm erweitert werden.¹⁵⁻¹⁸ In dieser Arbeit beziehen sich die Begriffe Nanopartikel und Kolloid auf Partikel in der Größenordnung zwischen 1 nm und 1000 nm.

Wie aus den unterschiedlichen Definitionen hervorgeht, sind kolloidale Systeme und Nanopartikel hauptsächlich aufgrund ihrer Größe interessant. So haben Nanopartikel Eigenschaften, die sich sowohl von den Eigenschaften der einzelnen Atome, aus denen sie bestehen, als auch von den Eigenschaften größerer Partikel oder Festkörper unterscheiden.¹⁵

So verändert sich das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen der Materialien in nanoskaliger Größe so sehr, dass die Eigenschaften der Oberfläche die Eigenschaften der Materialien maßgeblich bestimmen. Vor biologischem Hintergrund sind Nanomaterialien interessant, da sie aufgrund ihrer Größe dazu in der Lage sind, von Zellen aufgenommen zu werden. Daher können Nanopartikel dazu genutzt werden, Substanzen in Zellen zu schleusen, die sonst gar nicht oder nur schlecht ins Innere der Zellen gelangen würden.

Zunächst können kolloidale Systeme gemäß ihres Aufbaus klassifiziert werden.

1.1.1 Einteilung kolloidaler Systeme

Kolloidale Systeme lassen sich nach *H. Staudinger* in Dispersionskolloide, Molekülkolloide und Assoziationskolloide klassifizieren.^{12, 13}

Bei Dispersionskolloiden handelt es sich dabei um in der kontinuierlichen Phase unlösliche Partikel. Dispersionskolloide sind thermodynamisch instabil und meist polydispers. Der kolloidale Zustand kann jedoch durch elektrostatische oder sterische Stabilisierung aufrechterhalten werden. Dispersionskolloide können sowohl durch Zerkleinerung als auch durch Kondensation aus atomaren und molekularen Dimensionen entstehen.

Molekülkolloide hingegen bestehen aus in einem Medium gelösten Makromolekülen. Sie stellen daher thermodynamisch stabile, lyophile Systeme dar. Die Partikelgröße ergibt sich aus den Makromolekülen selbst, die zumeist eine geknäulte Form annehmen. Molekülkolloide werden häufig aus Polymeren oder Biomolekülen gebildet.

Assoziationskolloide (Mizellkolloide) sind ebenfalls lyophil und thermodynamisch stabil. Jedoch bilden hierbei zunächst gelöste Tensideinzelmoleküle sogenannte Mizellen mit kolloidalen Dimensionen aus. Bei einer bestimmten kritischen Mizellbildungskonzentration kommt es durch Selbstorganisation der Moleküle spontan zur Ausbildung der Assoziationskolloide. Dieser Prozess ist reversibel.

Außerdem lassen sich kolloidale Systeme nach *Ostwald* anhand der Aggregatzustände der dispersen und kontinuierlichen Phase einteilen (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Einteilung kolloidaler Systeme nach Ostwald^{12, 13}

Bezeichnung	disperse Phase	kontinuierliche Phase	Beispiel
feste Sole	fest	fest	Goldrubinglas
Suspension	fest	flüssig	Deckfarbe
feste Aerosole	fest	gasförmig	Staub
feste Emulsionen	flüssig	fest	Opal
Emulsionen	flüssig	flüssig	Milch
flüssige Aerosole	flüssig	gasförmig	Nebel
feste Schäume	gasförmig	fest	Styropor
flüssige Schäume	gasförmig	flüssig	Seifenschaum

1.1.2 Kolloidchemische Grundlagen

Thermodynamisch ist zunächst jedes Dispersionskolloid bestrebt, zu agglomerieren. Wie oben bereits erwähnt wurde, können Dispersionskolloide jedoch durch elektrostatische oder sterische Wechselwirkungen kinetisch stabilisiert werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen werden in der DLVO-Theorie (*Derjagin, Landau, Verwey, Overbeek*) behandelt. Dazu beschreibt die DLVO-Theorie analog zum *Lennard-Jones-Potential* quantitativ die Anziehungs- und Abstoßungskräfte, die zwischen den kolloidalen Partikeln wirken. Die Summe aus Abstoßungs- und Anziehungsenergien ergibt die Wechselwirkungsenergie und wird in Abhängigkeit des Abstandes zweier Partikel gemäß Formel 1 beschrieben.

$$\Delta G = \Delta G^{\text{Anziehung}} + \Delta G^{\text{Abstoßung}} \quad (1)$$

Dabei ist ΔG die freie Energie des Systems. Attraktive Energien besitzen ein negatives Vorzeichen, während repulsive Energien ein positives Vorzeichen erhalten. Sowohl attraktive als auch repulsive Energien nehmen mit dem Abstand ab. Für kleine Moleküle sind die attraktiven Energien proportional zu H^{-6} , während die repulsiven Energien proportional zu H^{-12} sind, wobei H der Abstand ist. In **Abbildung 1** sind Energie-Abstands-Kurven zur Illustration der DLVO-Theorie gezeigt. Hierbei wurde die freie Energie des Systems ΔG gegen den Abstand H aufgetragen.

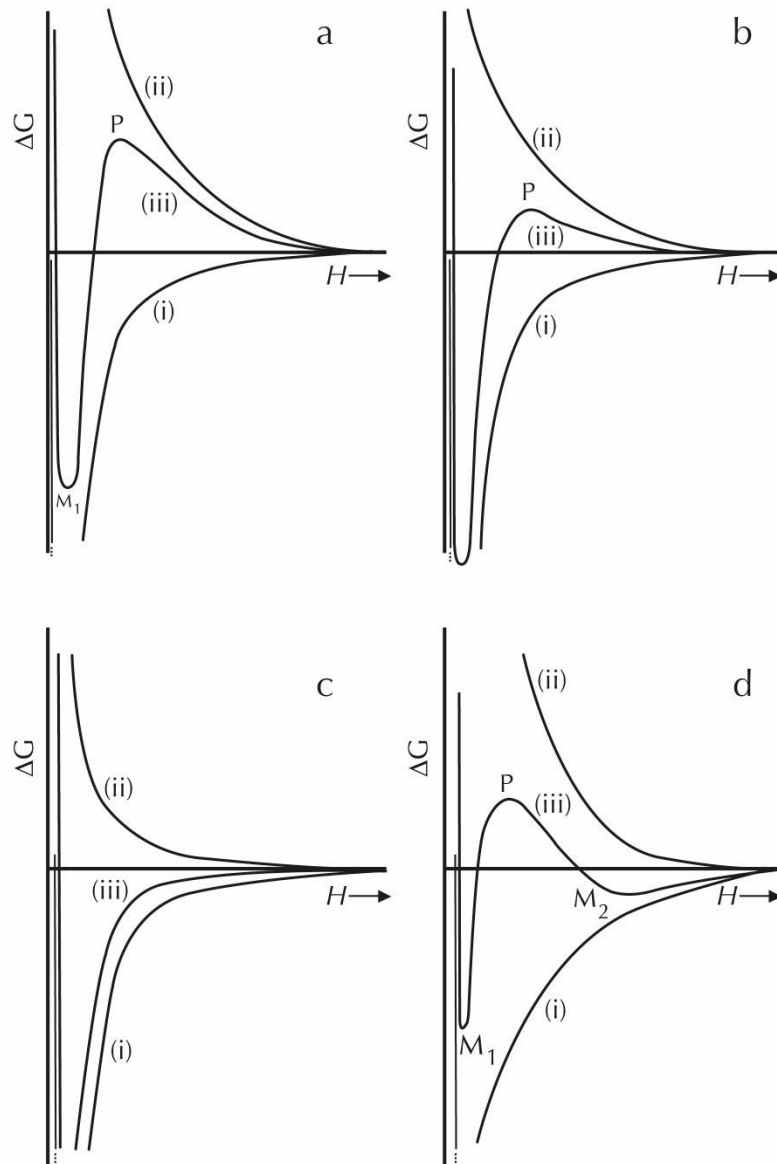


Abbildung 1: Energie-Abstands-Kurven zur Illustration der DLVO-Theorie. Die freie Energie des Systems (iii) ergibt sich aus der Addition der repulsiven (ii) und attraktiven (i) Energien. (Entnommen aus Quelle¹⁹)

Die kolloidalen Dispersionen streben den Zustand minimaler Energie im Minimum M_1 an. In diesem Zustand sind die Partikel agglomeriert. Durch repulsive Wechselwirkungen kann jedoch die Agglomeration durch eine Energiebarriere mit einem Maximum P verhindert werden. Bevor die Partikel agglomerieren, muss diese Energiebarriere zunächst überwunden werden. **Abbildung 1a** stellt eine Energie-Abstands-Kurve eines kolloidal stabilen Systems dar. Die Agglomeration wird durch eine hohe Energiebarriere verhindert. In **Abbildung 1b** ist die Energiebarriere so klein, dass sie leicht überwunden werden kann. Hierbei

handelt es sich also um ein kolloidal instabiles System. In **Abbildung 1c** existiert keine Energiebarriere, sodass Partikel keine Aktivierungsenergie zur Agglomeration benötigen. **Abbildung 1d** zeigt die Situation, in der die Partikel im sekundären Minimum M_2 ausflocken können. Diese Flocken sind allerdings nur schwach assoziiert und können relativ leicht wieder dissoziieren.

Die attraktiven Wechselwirkungen kolloidaler Systeme sind hauptsächlich auf *van-der Waals* Wechselwirkungen zurückzuführen.

Repulsive Wechselwirkungen können unter anderem durch elektrostatische Abstoßung und sterische Abstoßung hervorgerufen werden.

So akkumulieren kolloidale Teilchen durch Adsorption Anionen oder Kationen an ihrer Oberfläche. Dadurch ist die Konzentration der Ionen an der Oberfläche der Partikel höher als im Volumen der Dispersion. Es bildet sich daher eine elektrochemische Doppelschicht aus. Diese besteht laut Stern-Modell aus einer starren inneren Schicht (innere Stern-Schicht) und einer diffusen äußeren Schicht. Die um das Teilchen entstehende Ladungswolke ist in **Abbildung 2** schematisch dargestellt ist.

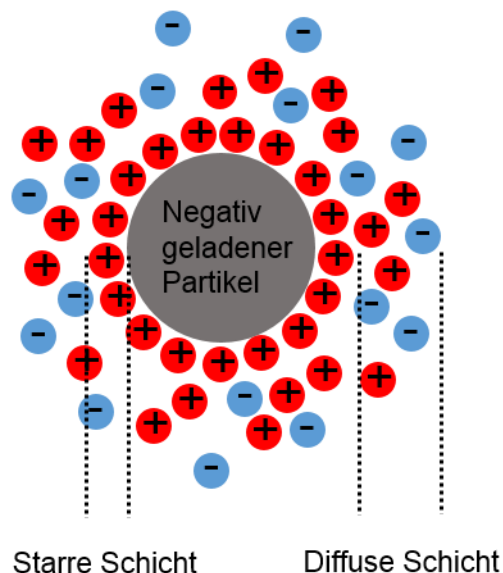


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ladungsaufbaus eines kolloidalen Partikels. (Nachgezeichnet aus Quelle¹²)

Die Ladungswolken, die jeweils zwei gleiche Teilchen umgeben, sorgen durch elektrostatische Wechselwirkung dafür, dass sich die Partikel gegenseitig abstoßen. Die Größe der Ladungswolke beeinflusst somit die kolloidale Stabilität.

Der Zusatz an Elektrolyt kann die Ladungswolke verkleinern und somit Agglomeration hervorrufen.

Die Ladung kolloidaler Partikel kann über das Zetapotenzial charakterisiert werden.

Der Potentialverlauf in Abhängigkeit des Abstandes von der Oberfläche eines Partikels ist in **Abbildung 3** schematisch dargestellt.

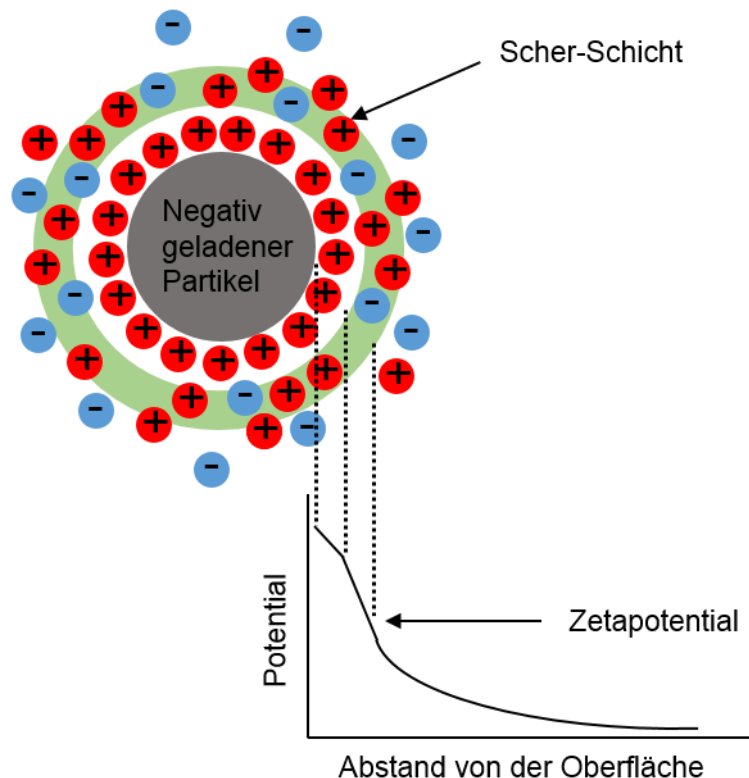


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Potentialverlaufs in der elektrochemischen Doppelschicht unter Annahme des Stern-Modells. (Nachgezeichnet aus Quelle²⁰)

Der Potentialverlauf ist nach dem Stern-Modell dargestellt. Dieses Modell ergibt sich aus der Kombination der Doppelschicht-Modelle von *Helmholtz* und *Gouy-Chapman*.¹²

In der starren Schicht sind die Ionen zunächst stark an der Oberfläche des Partikels adsorbiert und wenig beweglich. Da die Ionen zum Partikel einen Mindestabstand haben, fällt das Potential in der starren Schicht linear mit dem Abstand ab. In der diffusen Schicht fällt das Potential hingegen exponentiell mit dem Abstand gegen Null ab. Die Konzentration an Ionen gleicht sich mit steigendem Abstand zur Partikeloberfläche der Konzentration an Ionen im

Volumen an, sodass das Potential hier null ist. Innerhalb der diffusen Schicht existiert ein weiterer Bereich, in dem die Ionen und das Partikel eine Funktionseinheit bilden. Dieser Bereich der diffusen Schicht wird als Scherschicht bezeichnet. Innerhalb dieses Bereichs bewegen sich Ionen und Partikel als Einheit. Die Differenz des Potentials der Volumenphase und der Scherschicht wird als Zetapotenzial bezeichnet.²⁰

Als Faustregel werden Dispersionen mit einem Zetapotenzial größer als ± 30 mV als kolloidal stabil bezeichnet.^{20, 21}

Sterische Stabilisation hingegen kann vor allem durch räumlich anspruchsvolle Polymere erreicht werden. Die sterische Stabilisierung der kolloidalen Dispersion hängt dabei von der Molekularmasse und der Konzentration des Polymers ab. Bei der sterischen Stabilisierung adsorbieren die Polymermoleküle so auf der Oberfläche der Partikel, dass sie als Barriere einen Mindestabstand zweier Partikel gewährleisten. Beim Zusammenstoß sorgt die Deformierung der Polymerhülle durch osmotische, elastische und entropische Effekte für eine Abstoßung der Partikel.

Die Abhängigkeit des Verhaltens eines Dispersionskolloides von der Konzentration des Polymers ist in **Abbildung 4** schematisch dargestellt.

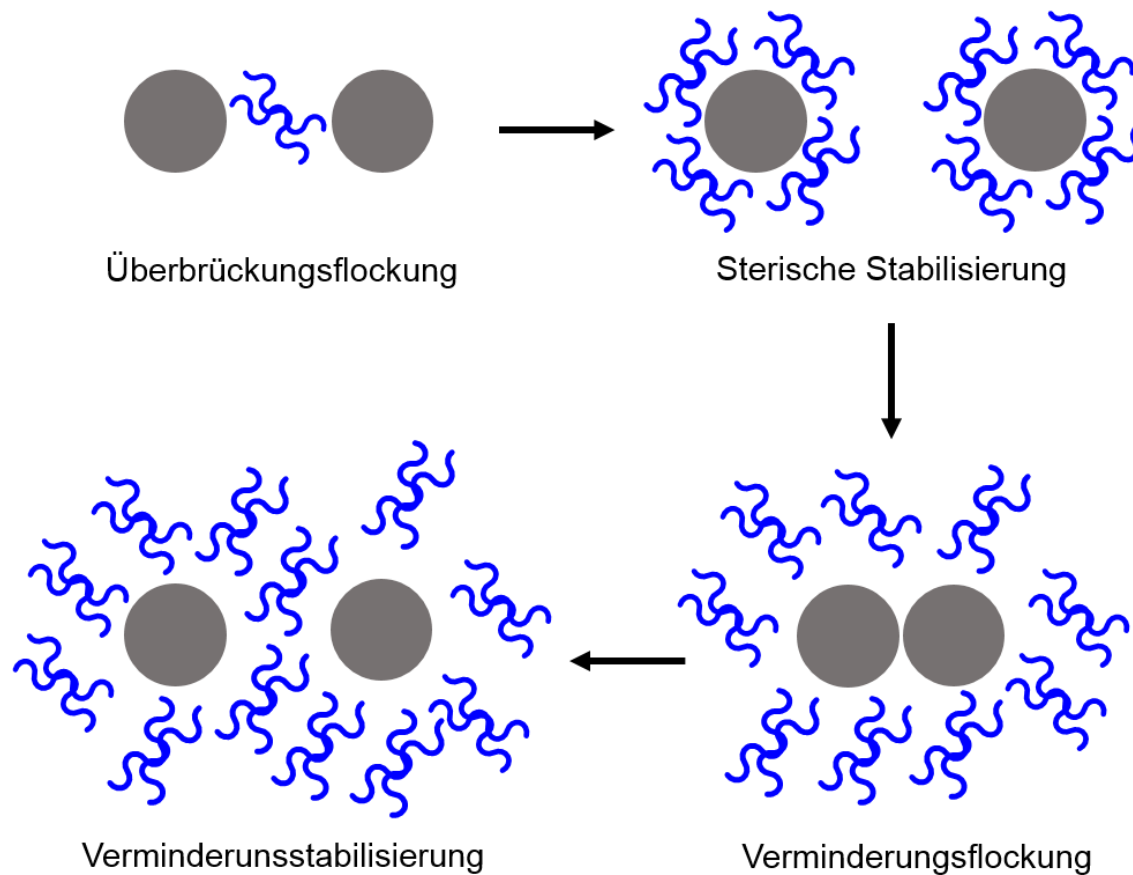


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Verhaltens eines Dispersionskolloides bei unterschiedlicher Polymerkonzentration. Die Konzentration an Polymer nimmt in Richtung der Pfeile zu. (Nachgezeichnet aus Quelle¹²⁾)

Bei zu geringer Konzentration an Polymer kommt es zunächst zur Überbrückungsflockung. In diesem Fall kann ein Polymermolekül an die Oberflächen mehrerer kolloidaler Partikel adsorbieren und dadurch die Agglomeration verursachen.

Bei optimaler Polymerkonzentration kommt es zur Ausbildung von Polymerschichthüllen um die Partikel, was zu sterischer Stabilisierung führt.

Ist die Konzentration an Polymer zu hoch kann es zunächst zur Verminderungsflockung kommen. Aufgrund der hohen Konzentration an Polymer in der kontinuierlichen Phase bildet sich ein hoher osmotischer Druck aus, wenn die Partikel in gegenseitige Nähe kommen. Die Moleküle der kontinuierlichen Phase verlassen dadurch den Zwischenraum zwischen den Partikeln und es kommt zur Verminderungsflockung.

Bei noch höherer Konzentration an Polymer kommt es hingegen zu Verminderungsstabilisierung. Aufgrund der großen Menge an Polymermolekülen

werden Zusammenstöße von Partikeln verhindert, sodass es nicht zur Agglomeration kommt.

Neben der elektrostatischen und der sterischen Stabilisierung von Dispersionskolloiden, können diese auch durch eine Kombination elektrosterisch stabilisiert werden. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn Polyelektrolyte an der Oberfläche von kolloidalen Partikeln adsorbieren. Ein Beispiel eines Polyelektrolyten bilden die Nukleinsäuren, die neben der Stabilisierung kolloidaler Dispersionen auch noch Effekte in biologischen Systemen hervorrufen können.

Dispersionskolloide können aus verschiedensten Materialien, wie beispielsweise Metallen oder Keramiken, darunter Calciumphosphat, gebildet werden.

1.1.3 Calciumphosphat-Nanopartikel

Calciumphosphat kann als Feststoff in unterschiedlichen Phasen vorkommen, die sich über das molare Verhältnis von Ca/P charakterisieren lassen. Die meisten Calciumphosphate sind dabei in Wasser bei neutralen oder basischen pH Werten schwerlöslich bzw. unlöslich. Im Säuren hingegen sind die Calciumphosphate wasserlöslich. Das Ca/P-Verhältnis liegt bei stöchiometrischen Calciumphosphaten zwischen 0,5 und 2,0. In der Regel sind Calciumphosphate mit einem höheren Ca/P-Verhältnis schlechter in Wasser löslich.

Vor biologischem Hintergrund ist Calciumphosphat vor allem als anorganischer Bestandteil der Hartgewebe (Zähne und Knochen) bekannt. Hierbei kommt das Calciumphosphat in Säugetieren als Hydroxylapatit (HAP) vor. Die stöchiometrische Zusammensetzung von Hydroxylapatit geht aus der Summenformel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ hervor. Da in biologischen Systemen jedoch nichtstöchiometrische Apatite vorliegen, liegt das Ca/P-Verhältnis zwischen 1,5 und 1,67.^{22, 23} Dabei kommt Calciumphosphat hauptsächlich nanopartikulär vor.²⁴ Aus diesem Grund gelten Calciumphosphat-Nanopartikel als sehr gut biokompatibel. Die Synthese von Calciumphosphat-Nanopartikeln ist einerseits interessant, da sie als Beschichtung von Endoprothesen das Anwachsen an den Knochen erleichtern können. Andererseits können Calciumphosphat-Nanopartikel mit unterschiedlichen Biomolekülen funktionalisiert werden. Da sie aufgrund ihrer Größe von Zellen aufgenommen werden, können sie zum Transport von Wirkstoffen genutzt werden.^{10, 24-27}

Calciumphosphat-Nanopartikel können zudem leicht und schnell synthetisiert werden. Abhängig von den Bedingungen, unter denen die Synthese stattfindet, können verschiedene Phasen dargestellt werden. Dabei spielen viele Faktoren eine Rolle, unter anderem der pH-Wert, das eingesetzte Ca/P-Verhältnis und die Temperatur. Die Kristallisation aus übersättigten Lösungen verläuft dabei nach *Ostwald-Lussac* über mehrere Stufen. Zunächst wird die energetisch ungünstigste Phase als erste Phase gebildet. Dies ist zumeist amorphes Calciumphosphat (ACP). Hydroxylapatit (HAP) kann jedoch aus ACP durch spontan erfolgende Transformation gebildet werden.²³⁻²⁵ Die Phase des Calciumphosphats kann im biologischen Kontext eine Rolle spielen. So scheint ACP das Knochenwachstum besser anzuregen als kristalline Calciumphosphate. Bei der Transfektion von A549 Zellen hingegen war der Unterschied zwischen Brushit- und HAP-Nanopartikeln nur sehr gering.²⁸

Die Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Biomolekülen ermöglicht es, Wirkstoffe in Zellen zu transportieren. So adsorbieren organische Moleküle, Proteine oder Nukleinsäuren gut an der Oberfläche von Calciumphosphat.^{24, 29-34} Bei der Verwendung von Nukleinsäuren können diese gleichzeitig eine Dispersion von Calciumphosphat-Nanopartikeln kolloidal stabilisieren.

Der Adsorptionsprozess an „nackte“ Calciumphosphat-Oberflächen wird durch das Ersetzen von Ionen an der Oberfläche der Calciumphosphatkristalle durch geladene oder polare Gruppen der adsorbierenden Moleküle beschrieben. Dabei interagieren negativ geladene Gruppen eher mit Calciumionen, während positiv geladene Gruppen mit den Phosphationen interagieren können.^{10, 24} Die Adsorption von Proteinen und kleinen Molekülen kann darüber hinaus am besten mittels Freundlich- oder Langmuir-Isotherme beschrieben werden, und scheint irreversibel zu sein. Das heißt, dass keine Desorption durch Verdünnung stattfindet. Außerdem ist die Adsorption von der Kristallphase des Calciumphosphates abhängig.²⁴ Die Adsorption von DNA an die Oberfläche von Calciumphosphat-Nanopartikeln ist in **Abbildung 5** schematisch dargestellt. Dabei ist die Wechselwirkung der negativ geladenen Gruppen des Phosphatrückgrates der DNA mit den positiv geladenen Calciumionen illustriert.^{10, 35}

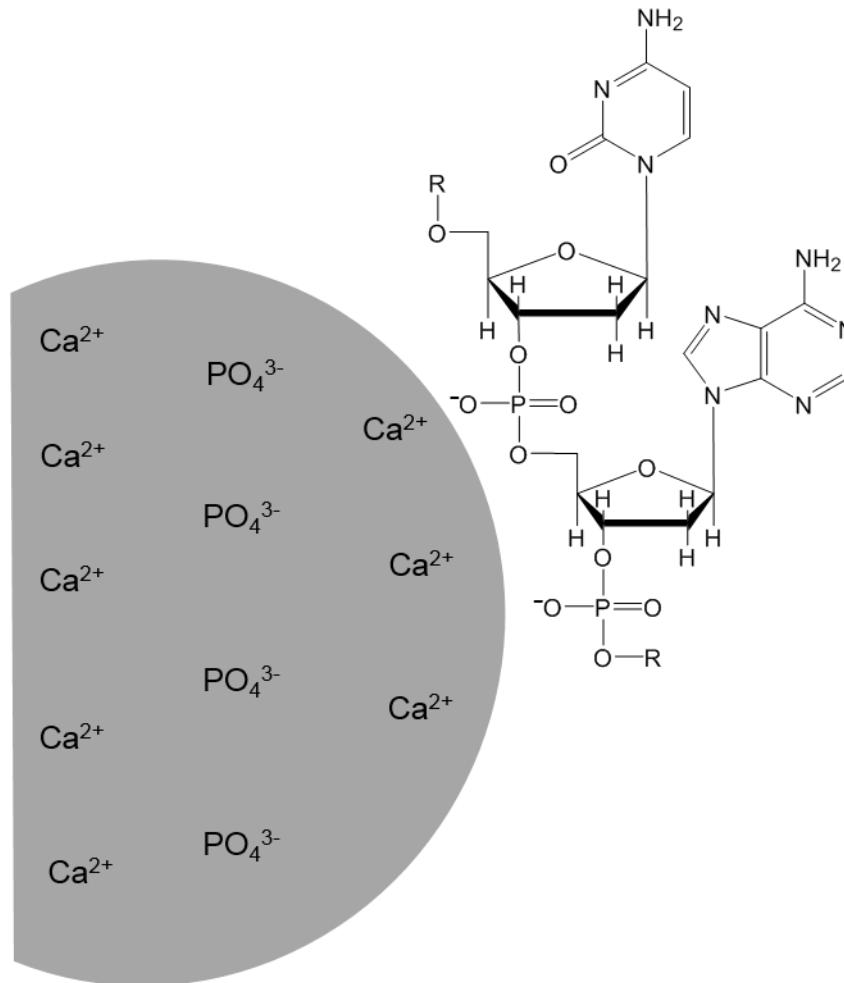


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion von Calciumphosphat und Nukleinsäuren am Beispiel von einzelsträngiger DNA mit den Nukleotiden Cytidin und Adenosin. R=weitere Nukleotide (Nachgezeichnet aus Quelle¹⁰)

Die Interaktion von Nukleinsäuren mit verschiedenen Calciumphosphat-Nanopartikeln wurde weiterhin untersucht. So wird für Citrat-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel die Interaktion über die große oder kleine Furche der DNA vorgeschlagen. Jedoch war die Calciumphosphat-Oberfläche bei dieser Studie durch Citrat besetzt und daher, wie auch die DNA, negativ geladen.³⁶ Auf der anderen Seite war die Interaktion von positiv geladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln mit DNA stärker als die Interaktion von „nackten“ Calciumphosphat-Nanopartikeln mit DNA. Die positive Ladung wurde hierbei durch Funktionalisierung der Oberfläche mit Aminosilylgruppen erreicht.²⁸

Das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen ist interessant, da so Einfluss auf die Proteinbiosynthese genommen werden kann. Seit der Entdeckung der „Standard-Calciumphosphat-Methode“ 1973 von Graham und van der Eb konnten

Calciumphosphat-Nanopartikel durch verschiedene Modifikationen für das Einschleusen von Nukleinsäuren optimiert werden.³⁷

So führte die Kontrolle der Größe und Morphologie der Nanopartikel zu einer verbesserten Transfektionseffizienz. Durch die Entwicklung mehrschaliger Calciumphosphat-Nanopartikel konnten die Nukleinsäuren vor dem enzymatischen Abbau geschützt werden.³⁸ Weiterhin wurden aufgrund einer PEI-Schale positiv geladene Calciumphosphate besser von Zellen aufgenommen.^{39, 40} Darüber hinaus konnten Calciumphosphat-Nanopartikel mit einer Silikaschicht beschichtet werden.^{28, 41} Calciumphosphat-Nanopartikel konnten sowohl über chemische Modifizierung der Silikaschale als auch über Modifizierung der PEI-Schale mit Gruppen zur gezielten Aufnahme in bestimmte Zellen versehen werden.⁴¹ So konnten Tumore *in vivo* gezielt mit den Nanopartikeln im Rahmen von photodynamischer Therapie, sowie Gentherapie behandelt werden.^{40, 42}

1.2 Biologischer Hintergrund

Im biomedizinischen Kontext sind Nanopartikel hauptsächlich für den Transport von funktionellen Molekülen (Wirkstoffen), sowie für therapeutische und diagnostische Zwecke interessant.

So können beispielsweise die optischen Eigenschaften von Nanopartikeln für diagnostische Zwecke sehr hilfreich sein. Das für *in vivo-Imaging* nutzbare Fenster im elektromagnetischen Spektrum liegt bei 650-900 nm. Dieser Bereich ist mit organischen Molekülen schwer zugänglich. Vor allem Nanopartikel aus Halbleitermaterialien (*quantum dots*) und metallische Nanopartikel können über ihre Größe und Morphologie ihre optischen Eigenschaften verändern, sodass sie für diagnostische Zwecke verwendbar sind.⁴³

Therapeutisch können Nanopartikel unter anderem zur Bekämpfung von Krebszellen eingesetzt werden. Metallische Nanopartikel können dabei lokal angeregt werden und Zellen durch Temperaturerhöhung abtöten. Dabei können Nanopartikel je nach Material durch Licht (*photothermal therapy*, PTT) oder durch ein äußeres Magnetfeld angeregt werden.^{43, 44} Erfüllen Nanopartikel sowohl diagnostische als auch therapeutische Zwecke, so wird von *theranostics* gesprochen.⁴⁵

Für den Transport von Wirkstoffen können verschiedene Nanopartikel mit aktiven Biomolekülen funktionalisiert oder beladen werden. Proteine oder Nukleinsäuren können leicht in Polymer-Nanokapseln transportiert werden.⁴⁶⁻⁴⁸ Die Oberfläche von Nanopartikeln kann über säurelabile Linkermoleküle mit Wirkstoffen funktionalisiert werden. Dadurch können die Wirkstoffe auf den Partikeln die Zellmembran überwinden und werden dann im Lysosom freigesetzt.^{43, 49} Calciumphosphat-Nanopartikel können die verschiedensten Moleküle, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, auf ihrer Oberfläche adsorbieren und so für deren Transport sorgen.³⁴ Der Nutzen von Nanopartikeln für den Transport von Wirkstoffen liegt darin, dass die Bioverfügbarkeit von hydrophoben Molekülen verbessert werden kann. Andererseits können Nanopartikel dabei helfen, hydrophile Substanzen, die nicht von Zellen aufgenommen werden, über die Zellmembran zu schleusen. So ist das Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellen aufgrund der negativen Ladung und den hydrophilen Eigenschaften der Nukleinsäure ohne geeignete Hilfsmittel nicht effizient möglich.

1.2.1 Genvektoren

Das Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellen ist sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Gentherapie von Interesse. Aufgrund der hohen negativen Ladungsdichte und der hydrophilen Eigenschaften von Nukleinsäuren ist es jedoch nicht ohne weiteres möglich, diese über die Zellmembran zu transportieren.

So gibt es mittlerweile mehrere Strategien, Nukleinsäuren in Zellen einzubringen, die auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Am effizientesten gelingt der Transport mittels viraler Transfektionssysteme.^{10, 50} So sind Viren evolutionär darauf spezialisiert, ihre Nukleinsäuren zur Replikation in Zellen einzubringen. Um virale Mechanismen zur Transfektion auszunutzen, können die Viren genetisch modifiziert werden, sodass sie sich nicht mehr vermehren können. Die genetische Sequenz kann dabei durch eine gewünschte Sequenz ersetzt werden. Anschließend kann die spezialisierte Maschinerie des Virus die gewünschte Nukleinsäuresequenz in Zellen einbringen. Die Maschinerie der Viren involviert dabei zumeist Strategien, die Zellmembran zu überwinden, dem lysosomalen Abbau zu entkommen und teilweise auch, Geninformation in den Zellkern zu bringen. Abhängig vom verwendeten Virus kann DNA in die zelluläre DNA eingebaut werden, oder parallel zu der zellulären DNA exprimiert werden.⁵⁰ Jedoch haben virale Transfektionssysteme auch viele Nachteile. Zum einen sind sie in der Produktion sehr teuer, und sie haben auch nur limitierte Kapazität, fremde Nukleinsäuren aufzunehmen.³ Außerdem können virale Proteine Entzündungen und starke Immunreaktionen hervorrufen. Ein weiteres Risiko besteht in der Beschädigung der zellulären DNA.⁵⁰

Neben viralen Ansätzen können Nukleinsäuren über physikalische oder chemische Methoden in Zellen geschleust werden. Dabei beruhen die physikalischen Methoden, wie zum Beispiel Elektroporation oder *hydrodynamic injection*, auf der Schädigung der Zellmembran. Durch die vorübergehende Schädigung entstehen Löcher in der Zellmembran, durch die die Nukleinsäuren eindringen können¹¹. Für therapeutische Zwecke sind physikalische Methoden aufgrund von schlechter Effizienz und aufwendiger Arbeitsweisen also zunächst nicht anwendbar und werden daher hier nicht weiter beschrieben.

Chemische Methoden hingegen basieren zumeist auf der Verwendung von Nanopartikeln. Eine Vielzahl verschiedener Materialien wurde bisher für den

nanopartikulären Transport von Nukleinsäuren über die Zellmembran verwendet. Wie bereits angedeutet wurde, können Nukleinsäuren beispielsweise in PLGA-Polymernanopartikeln verkapselt werden.⁴⁸ Außerdem wurden unter anderem Nanopartikel aus Gold,^{51, 52} Silika⁵³⁻⁵⁵ oder eben Calciumphosphat^{38, 39, 56, 57} für den Gentransfer eingesetzt. Eine weitere Strategie involviert die Verwendung von Nanopartikeln aus Lipiden oder amphiphilen Molekülen (Mizellen), die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften mit der Zellmembran interagieren können.

Die Verwendung von Nanopartikeln bietet viele Vorteile. So ist die Beladungskapazität aufgrund der großen Oberfläche von Nanomaterialien relativ hoch. Außerdem bieten Nanopartikel die Möglichkeit, über chemische Modifizierungen nur von bestimmten Zellen aufgenommen zu werden. Die Verwendung von biokompatiblen Materialien verringert die Toxizität. Hinzu kommen die geringen Kosten und die einfache Herstellung.^{10, 50, 58, 59}

Die Mechanismen, die zur zellulären Aufnahme von Nanopartikeln führen, werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

1.2.2 Endozytose

Die Endozytose dient Zellen unter anderem zur Aufnahme von Makromolekülen und Nährstoffen aus dem extrazellulären Raum. Dabei kommt es zu Einstülpungen der Zellmembran. Es werden Vesikel geformt, die im intrazellulären Raum von der Zellmembran abgetrennt werden. Nach weiterer Prozessierung kann der Inhalt aus den Vesikeln dann ins Zytosol der Zelle gelangen, oder wieder aus der Zelle herausgeschleust werden.

Zunächst werden zwei Endozytosemechanismen basierend auf der Größe der Einstülpungen voneinander unterschieden. Dabei handelt es sich um Phagozytose und Pinozytose.

Phagozytose wird auch als Zelfressen bezeichnet und kann nur von einigen spezialisierten Zellen durchgeführt werden. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Immunzellen. Die Phagozytose dient demnach hauptsächlich der Aufnahme und Zerstörung von potentiell schädlichem Material, wie z.B. Viren oder Bakterien. Die Einstülpungen der Zellmembran werden dabei als Phagosome bezeichnet und können 5-10 µm große Durchmesser annehmen.^{60, 61}

Pinozytose hingegen wird als Zelltrinken bezeichnet und wird von fast jeder eukaryotischen Zelle durchgeführt. Pinozytose kann abhängig von den involvierten Molekülen weiter kategorisiert werden.

Abbildung 6 gibt einen Überblick über die wichtigsten Endozytosemechanismen.

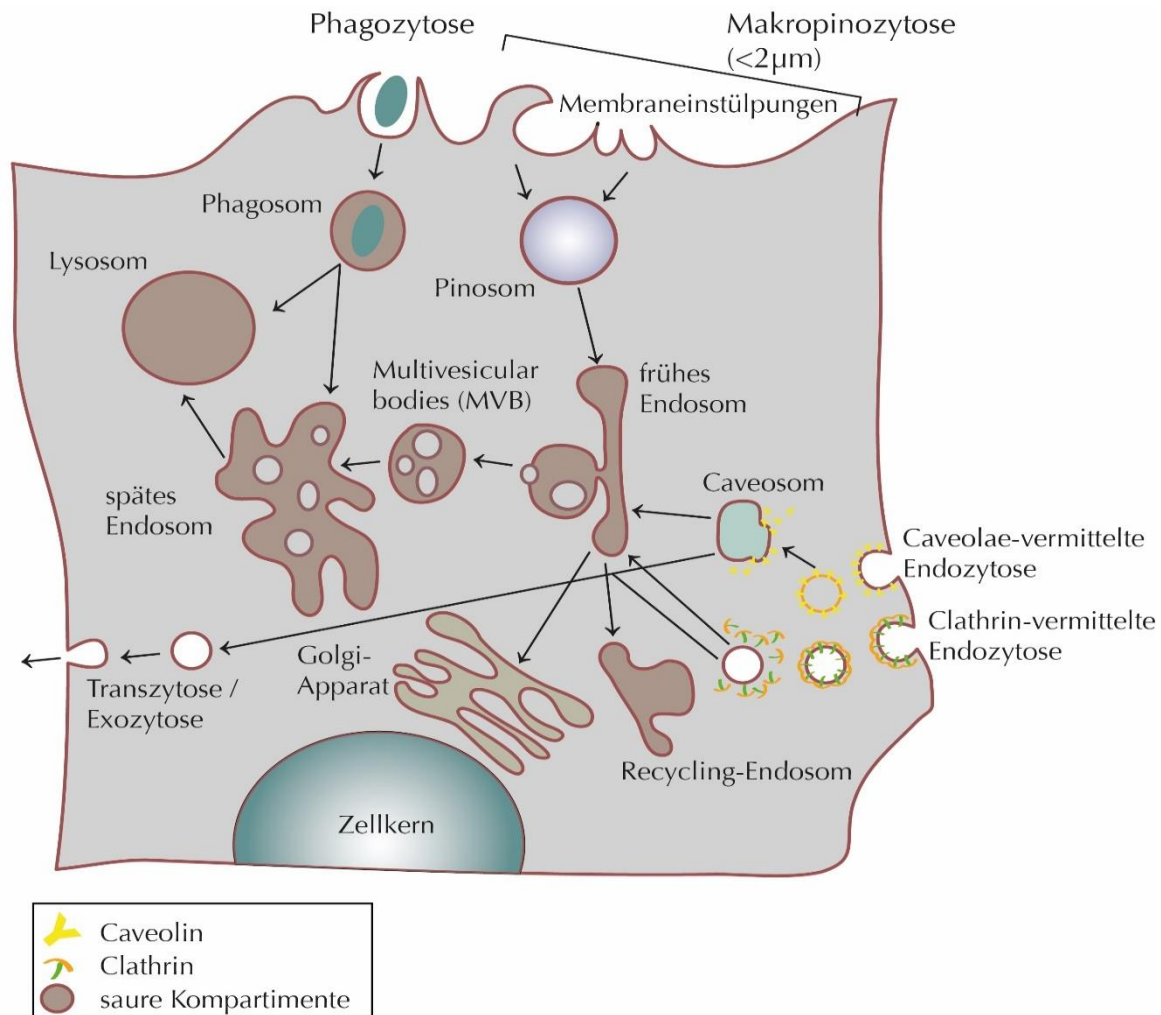


Abbildung 6: Schematische Darstellung der wichtigsten Endozytosemechanismen. (Entnommen aus Quelle⁶²; Nachgezeichnet aus Quelle⁶⁰)

Zu den bekanntesten Endozytosemechanismen gehören unter anderem Clathrin-vermittelte Endozytose, Caveolae-vermittelte Endozytose, Makropinozytose und Phagozytose.

Zu den am meisten untersuchten Endozytosemechanismen ist die Clathrin-abhängige Endozytose zu zählen. Hierbei wird zunächst durch extrazelluläre Bindung von Liganden an Transmembranproteine die Formation von „coated pits“ stimuliert. Diese „coated pits“ sind kleine Einstülpungen der Zellmembran, die

durch eine Anordnung mehrerer zytosolischer Proteine hervorgerufen werden. Das daran hauptsächlich beteiligte Protein ist das Clathrin. Die Interaktion mit weiteren Proteinen führt dann zur weiteren Einstülpung der Zellmembran und zur Ausbildung von Clathrin-bedeckten Vesikeln. Sobald sich die Vesikel von der restlichen Zellmembran lösen, trennt sich auch das Clathrin wieder von der Vesikelmembran, und die Vesikel werden intrazellulär weiter prozessiert.⁶⁰

Der Caveolae-vermittelte Endozytoseweg wurde bisher nicht so umfassend untersucht, wie der Clathrin-vermittelte Weg. Jedoch werden auch hier zunächst kleine Einstülpungen der Zellmembran gebildet. Diese werden als Caveolae bezeichnet und durch Caveoline gebildet.^{60, 63} Die Aufnahme von Stoffen führt dann zur Ausbildung von Caveolin-bedeckten Vesikeln.

Bei der Makropinozytose kommt es zu Ausstülpungen der Zellmembran. Diese formen Kompartimente, die in die Zelle aufgenommen werden. Dieser Prozess wird über das Aktin-Zytoskelett vermittelt und ist rezeptorunabhängig. Dabei können sogenannte Makropinosome mit Durchmessern von 0,5 µm bis 10 µm gebildet werden.^{60, 64}

Der Mechanismus, über den Nanopartikel von Zellen aufgenommen werden, ist einerseits vom Zelltyp abhängig.⁶⁵ Andererseits werden Nanopartikel abhängig von ihrer Ladung, Größe, Morphologie, Materialeigenschaften und Oberflächenbeschaffenheit durch unterschiedliche Mechanismen von Zellen aufgenommen.^{66, 67} Außerdem kann mehr als nur ein Endozytosemechanismus an der Aufnahme von Nanopartikeln beteiligt sein.

So fördert eine positive Partikelladung die Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran. Die Größe eines Nanopartikels entscheidet maßgeblich über den Endozytoseweg. Schließlich hängt die Größe der Vesikel auch vom Endozytosemechanismus ab. Außerdem können Nanopartikel durch physikalische Interaktionen mit der Zellmembran deren Verformung hervorrufen, was zur Aufnahme führen kann. Der optimale Durchmesser von sphärischen Nanopartikeln scheint zwischen 15 nm und 50 nm zu liegen.^{60, 68} Funktionalisierungen auf der Oberfläche von Partikeln können als Liganden für Rezeptoren in der Zellmembran fungieren. Desweiteren kann so die Interaktion mit Proteinen aus dem extrazellulären Medium beeinflusst werden. Somit wird auch der Endozytosemechanismus beeinflusst.^{68, 69} Diese Mechanismen sind noch recht unerforscht. Zunächst interagieren Nanopartikel in biologischen

Medien stark mit Proteinen und bilden schnell eine sogenannte Proteinkorona aus. Diese sollte die Oberflächenfunktionalisierung also eigentlich überdecken. Andererseits gibt es in der Literatur viele Berichte, in denen Nanopartikel abhängig von der Oberflächenfunktionalisierung gezielt von Zellen aufgenommen wurden.^{40, 41, 70, 71}

Für Calciumphosphat-Nanopartikel konnten sowohl Makropinozytose als auch Clathrin-abhängige und Caveolae-abhängige Endozytosewege nachgewiesen werden.^{72, 73}

Neben der Aufnahme von Nanopartikeln hängt deren Effekt auf die Zelle auch von der intrazellulären Prozessierung der Partikel ab. Soll die Proteinbiosynthese beispielsweise durch Nukleinsäuren beeinflusst werden, so müssen diese zunächst ins Zytosol oder in den Zellkern gelangen.

1.2.3 Intrazellulärer Transport

Sobald die Vesikel (Phagosome nach Phagozytose, Makropinosome nach Makropinozytose) intrazellulär von der Zellemembran abgetrennt sind, kommt es zum Austausch mit anderen Kompartimenten. Der intrazelluläre Transport der Vesikel hängt dabei sowohl von den aufgenommenen Substanzen als auch vom Endozytoseweg ab. So können Vesikel, die sich durch Caveolae-vermittelte Endozytose gebildet haben, oftmals Lysosomen umgehen.⁶⁵ Phagosome hingegen können schneller mit Lysosomen interagieren, um so degradierende Prozesse zu beschleunigen.⁶⁰ Generell interagieren die Vesikel jedoch zunächst mit Endosomen. Von dort kann weiterer Transport beispielsweise zum Golgi-Apparat stattfinden. Andererseits können die Endosomen zu Lysosomen reifen oder mit Lysosomen fusionieren, falls der Inhalt der Vesikel degradiert werden soll. Außerdem können Vesikel mit der Zellmembran fusionieren, um ihren Inhalt wieder aus der Zelle heraus zu schleusen (Exozytose).

Momentan sind die Mechanismen des intrazellulären Transportes von Nanopartikeln noch recht unbekannt.⁷⁴ Jedoch wird davon ausgegangen, dass durch Endozytose aufgenommene Nanopartikel meist auf endo-/lysosomalen Pfaden prozessiert werden.⁶⁹ Diese intrazelluläre Prozessierung dient der Degradation der zellfremden Nanomaterialien. So liegt der pH-Wert in den Endosomen bei 5-5,5. In den Lysosomen wird der pH-Wert weiter verringert und liegt zwischen 4,5-5. Desweiteren existieren in den Lysosomen viele Enzyme, die

der Degradation verschiedener Substanzen dienen. Werden mittels Nanopartikel empfindliche Substanzen, wie z.B. Nukleinsäuren, in Zellen geschleust, so ist der schnelle Austritt aus den Endo-/Lysosomen also von großer Bedeutung.

In **Abbildung 7** sind der intrazelluläre Transport und der Austritt von Nanopartikeln aus dem Lysosom schematisch dargestellt.

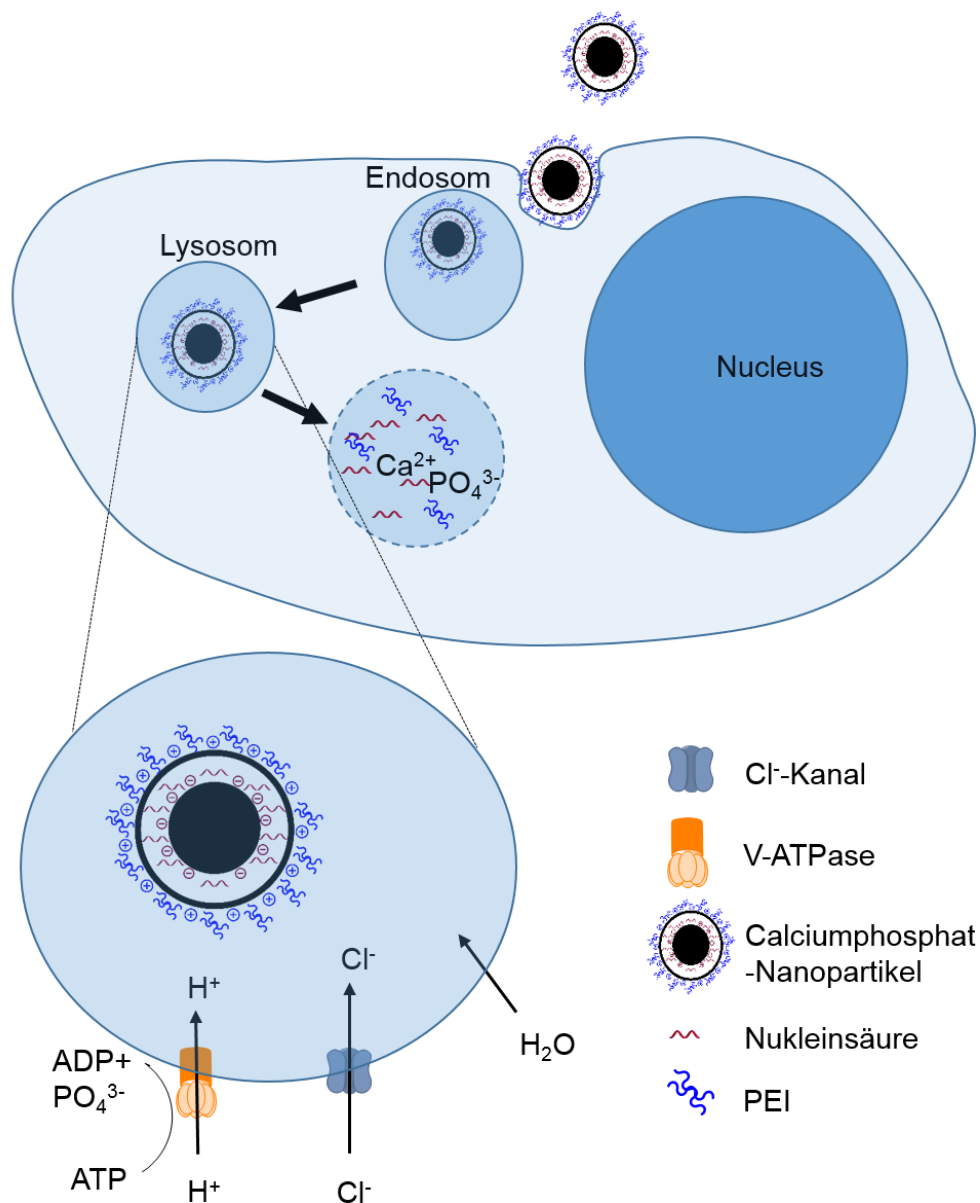


Abbildung 7: Illustration des Transports von Calciumphosphat-Nanopartikeln nach endozytotischer Aufnahme. PEI kann den Protonenschwammeffekt auslösen. Durch Erhöhung des osmotischen Druckes kommt es zum Platzen des Lysosoms. (Nachgezeichnet aus Quelle⁶⁸)

Die Freisetzung des Inhaltes aus Endosomen und Lysosomen kann unter anderem durch Erhöhung des osmotischen Druckes erreicht werden. So führt ein höherer osmotischer Druck zum Einstrom von Wasser. Dabei schwillt das Kompartiment an, bis es letztendlich platzt.

Der Anstieg des osmotischen Druckes kann verschiedene Ursachen haben. So ist Calciumphosphat bei niedrigen pH-Werten löslich. Die Auflösung des Materials führt dann durch Freisetzung der Ionen zum Anstieg des osmotischen Druckes.

Außerdem kann der osmotische Druck durch den sogenannten Protonenschwammeffekt erhöht werden.

Der niedrige pH-Wert in den Endo-/Lysosomen wird über die Aktivität der v-ATPase (*vacuolar ATPase*) generiert. Diese pumpt Protonen unter Hydrolyse von ATP aus dem Zytosol ins Innere der Endo-/Lysosomen. Damit das Membranpotential dabei nicht verändert wird, strömen gleichzeitig Cl⁻-Ionen über Cl-Kanäle ins Innere der Endo-/Lysosomen.^{75, 76} Dies führt zum Anstieg des osmotischen Druckes, der wiederum zum Einstrom von H₂O über die Membran führt.^{68, 77}

Werden die hineingepumpten Protonen nun durch puffernde Substanzen im inneren der Endo-/Lysosomen abgefangen, bleibt die v-ATPase aktiv. Dies führt zum weiteren Anstieg des osmotischen Druckes und dadurch zum Anschwellen der entsprechenden Kompartimente. Dieser Vorgang ist als „Protonenschwammeffekt“ bekannt.

Dieser Mechanismus der endo-/lysosomalen Freisetzung wird vor allem mit Polyaminen wie beispielsweise PEI in Verbindung gebracht. So steigt die Protonierung der Amine von PEI von 20 % auf 45 % bei einer Verringerung des pH-Wertes von 7 auf 5.⁷⁷⁻⁷⁹

1.2.4 Transfektion

Der Transport von zellfremden Nukleinsäuren ins Innere von Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Dies schließt sowohl den Transport von DNA als auch RNA ein.¹⁰ In dieser Arbeit bezieht sich Transfektion jedoch auf das Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellen mit dem Ziel, bestimmte Gene zu exprimieren. Wird hingegen RNA mit dem Ziel, die Expression bestimmter Proteine zu verringern, in Zellen geschleust, so wird dies als Genstummschaltung bezeichnet.

Zunächst wird bei der Transfektion zwischen transienter und permanenter Transfektion unterschieden. Bei der permanenten Transfektion wird die genetische Information in das Genom der transfizierten Zelle integriert. Die genetische Information wird bei der Zellteilung dann auch an die Tochterzellen weitergegeben. Dies kann zu einer permanenten Expression des entsprechenden Proteins führen.¹⁰

Bei der transienten Transfektion wird das eingebrachte genetische Material nicht in das Genom der transfizierten Zelle integriert. Dies ist zumeist bei der nanopartikulären Transfektion mit Plasmid-DNA (pDNA) der Fall.¹¹ Gelangt das Plasmid in den Zellkern, so liegt es dort als episomale DNA vor. Es kommt zunächst zu einer starken Expression des auf der DNA kodierten Proteins, die einige Tage andauert. In der Folge nimmt die Expression des Proteins ab. Das kann unter anderem auf Verdünnungseffekte während der Zellteilung zurückgeführt werden, da das Plasmid bei der Proliferation der Zellen nicht repliziert wird.¹¹

Der Mechanismus, der zur Expression der gewünschten Proteine durch Transfektion führt, ist am Beispiel der Transfektion durch Calciumphosphat-Nanopartikel in **Abbildung 8** schematisch dargestellt.

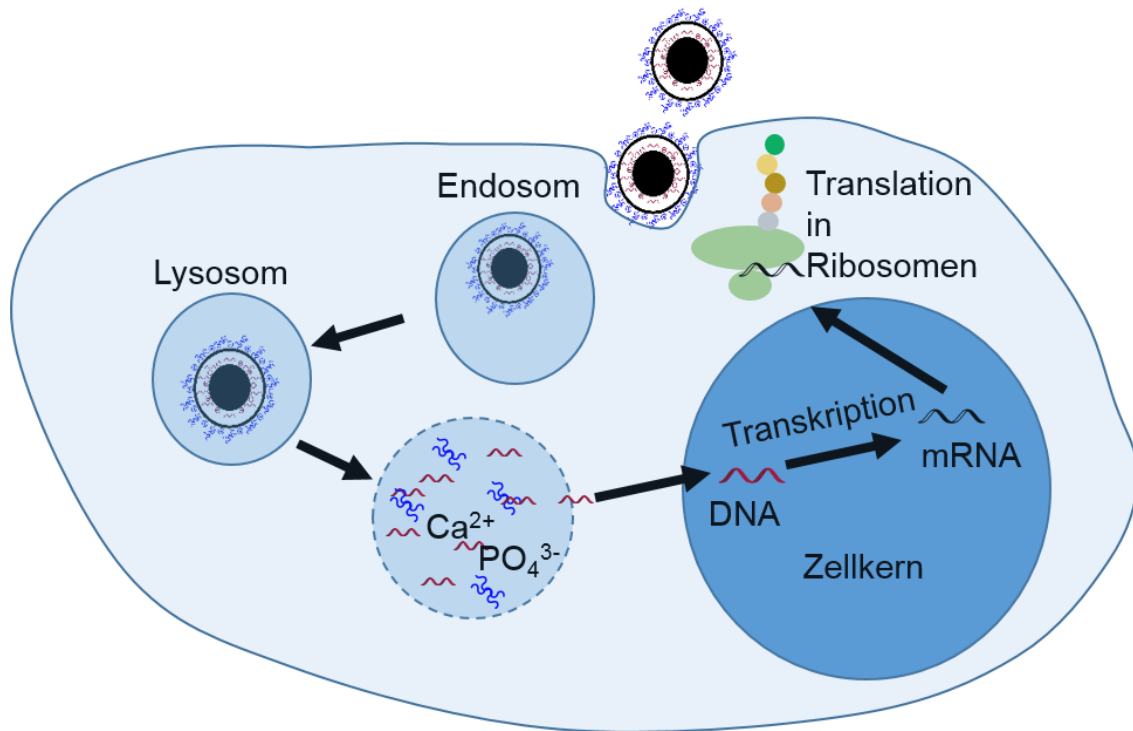


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Transfektion einer Zelle mittels funktionalisierter (DNA-beladener) Calciumphosphat-Nanopartikel.

Strategien, Nukleinsäuren in Zellen zu befördern, wurden in den vorherigen Abschnitten bereits beschrieben. Außerdem wurde beschrieben, auf welchem Weg die Nukleinsäure der lysosomalen Degradation entkommen kann. Damit ein durch zellfremde DNA kodiertes Protein exprimiert werden kann, muss die DNA zunächst in den Zellkern gelangen. Dazu muss die DNA intrazellulär transportiert werden und die Kernmembran muss überwunden werden. Passive Diffusion der DNA scheint beim intrazellulären Transport keine Rolle zu spielen.^{11, 80} Ein möglicher Mechanismus des Transports der DNA könnte über die Kernporen (NPC, *nuclear pore complexes*) erfolgen. Diese Poren sind 9-11 nm groß und erlauben die freie Diffusion von kleinen Molekülen über die Kernmembran. Aufgrund der Größe wäre dieser Mechanismus jedoch nur für Nukleinsäuren bestehend aus ~300 Basenpaaren möglich. Große Proteine können über aktiven Transport unter ATP-Hydrolyse in den Zellkern gelangen. Dazu ist jedoch eine NLS-Sequenz (*nuclear localization signal*) notwendig. Nun kann DNA mit NLS-Peptiden funktionalisiert werden, um den Kerntransport anzuregen. DNA kann aber auch Sequenz-spezifisch (DTS; *DNA nuclear targeting sequence*) mit NLS-

Peptiden im Zytoplasma interagieren. So führt die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) zum Transport von DNA in den Zellkern.^{11, 58, 81-83} Bei proliferierenden Zellen gelangt jedoch wahrscheinlich der größte Teil an Plasmid-DNA während des Zusammenbruchs der Kernmembran bei der Mitose in den Zellkern.^{11, 58}

Ist die DNA in den Kern gelangt, so kann sie durch RNA-Polymerasen in mRNA transkribiert werden. Nach Austritt aus dem Kern kann dann in den Ribosomen durch Translation der mRNA die Proteinbiosynthese stattfinden.

1.2.5 Genstummschaltung

Bei der Genstummschaltung wird die Expression von Proteinen durch RNA-Moleküle inhibiert. Dabei werden RNAi-Mechanismen (*RNA interference*) ausgenutzt. Diese umfassen Genstummschaltung durch siRNA (*small interfering RNA*) oder durch miRNA (*micro RNA*). Einen Sonderfall bilden shRNAs (*short hairpin RNA*), die auch zur Genstummschaltung eingesetzt werden können. Die beiden RNAi Mechanismen unterscheiden sich in ihrer Funktion, jedoch sind an beiden RNAi Mechanismen die gleichen Proteine im Zytosol beteiligt. Die Genstummschaltung durch Einschleusen von siRNA in eine Zelle mit Calciumphosphat-Nanopartikeln ist in **Abbildung 9** illustriert.

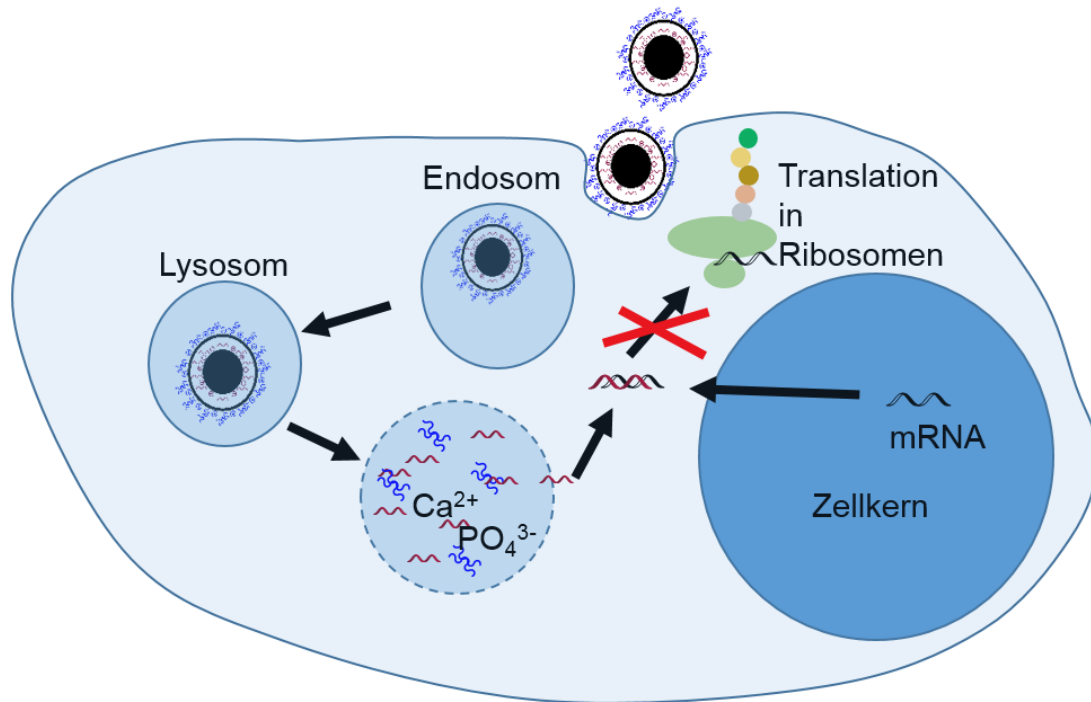


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Genstummenschaltungsmechanismus nach Einschleusen von siRNA in eine Zelle mit Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Im Unterschied zur Transfektion mit DNA muss die Nukleinsäure nun nicht mehr in den Zellkern gelangen, um ihre Funktion auszuüben. Vielmehr wird bei der Genstummenschaltung RNA ins Zytosol der Zelle gebracht. Nach Austritt aus dem Endo-/Lysosom kommt es durch Sequenz-spezifische Interaktion mit der mRNA eines bestimmten Proteins zur Inhibierung der Synthese des entsprechenden Proteins. Durch diesen Prozess kann das Expressionslevel bestimmter Proteine verringert werden.

Der Mechanismus der RNA-Interferenz ist am Beispiel von siRNA in **Abbildung 10** schematisch dargestellt.

Gelangt doppelsträngige RNA ins Zytosol der Zelle, so wird diese zunächst von dem Enzym „*Dicer*“ in Fragmente mit 21-23 Nukleotiden gespalten.⁸⁴ Diese siRNA wird dann von *Dicer* in den RISC-Komplex (*RNA induced silencing complex*) geladen.⁸⁵ Dies ist ein Komplex, der aus mehreren Proteinen besteht, unter anderem AGO2 (*Argonaute 2*). Durch Interaktion der siRNA mit AGO2 wird der sogenannte „sense-Strang“ der siRNA degradiert. Der „antisense-Strang“ verbleibt im RISC-Komplex und ermöglicht durch komplementäre Basenpaarung eine sequenzspezifische Erkennung von mRNA. Diese wird dann wiederum von

AGO2 degradiert. Dabei findet die Degradation von RNA durch AGO2 nur statt, falls die komplementäre Basenpaarung nahezu perfekt ist. Dies ist der funktionelle Unterschied zwischen miRNA und siRNA. Während bei siRNA eine perfekte Basenpaarung erwünscht ist, kommt es bei miRNA zu Basenfehlpaarungen. Dies führt einerseits dazu, dass miRNA nicht so spezifisch ist und somit mehrere Proteine simultan herunterregulieren kann. Andererseits wird die mRNA nicht unbedingt degradiert, sondern es kann auch nur die Translation verhindert werden. shRNA stellt einen Sonderfall dar, da diese durch vorherige Transfektion im Kern gebildet wird.^{3, 84-87}

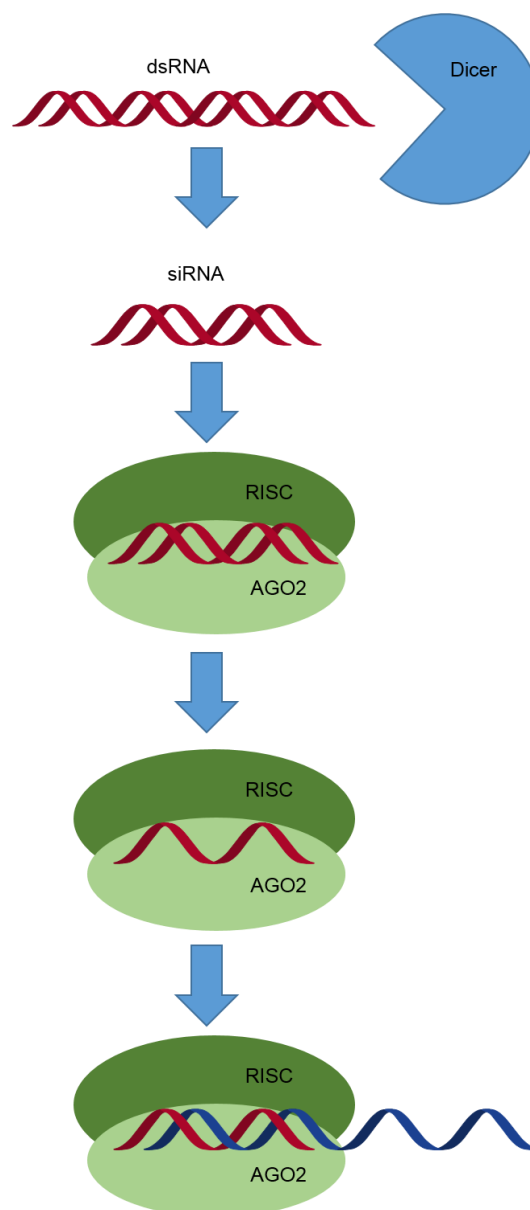


Abbildung 10: Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus mittels siRNA. (Nachgezeichnet aus Quelle³)

1.2.6 Darm

Sowohl die Transfektion als auch die Genstummschaltung wurden in dieser Arbeit auch *in vivo* nach rektaler Vergabe von Nanopartikeldispersionen getestet. Daher soll dieser Abschnitt einen kleinen Überblick über die Anatomie des Darmes und die damit auftretenden zusätzlichen Barrieren verschaffen.

Das Lumen des Darmes wird zunächst durch das Darmepithel begrenzt. Die Fläche des Darmepithels wird im Dünndarm durch Ausstülpungen, die sogenannten Zotten, vergrößert. Sowohl im Dickdarm als auch im Dünndarm gibt es außerdem Vertiefungen, die sogenannten Krypten. Die Darmwand ist in **Abbildung 11** schematisch dargestellt. Angrenzend an das Darmepithel befindet sich die Bindegewebeschicht *lamina propria*. In den Krypten sind sowohl undifferenzierte Enterozyten als auch multipotente Stammzellen lokalisiert. Diese Zellen sind teilungsfähig. Aus diesen Zellen bilden sich alle im Folgenden beschriebenen Darmepithelzellen. Dazu gehören Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Paneth-Zellen. Diese Zellen übernehmen verschiedene Aufgaben. So sind Enterozyten hauptsächlich für die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Nahrungsbrei verantwortlich. Außerdem bilden Enterozyten die sogenannte Glykokalyx aus. Dies ist ein etwa 400-500 nm dickes Netzwerk aus Glykoproteinen. Dieses Netzwerk soll verhindern, dass größere Partikel wie beispielsweise Viren oder Bakterien mit der Zellmembran der Enterozyten interagieren können.^{88, 89} Becherzellen sekretieren Schleim, der das gesamte Darmepithel bedeckt. Dieser dient einerseits als Gleitfilm für den Nahrungsbrei. Andererseits werden Proteasen und Erreger von der Epitheloberfläche ferngehalten. Enteroendokrine Zellen sezernieren Hormone, die beispielsweise an der Regulation der Sekretion des Magens beteiligt sind. Paneth-Zellen hingegen können Bakterien phagozytieren oder Entzündungen durch Sekretion von TNF- α stimulieren.

Die Zellen des Darmepithels gehen, wie oben bereits erwähnt wurde, aus den Krypten hervor. Von da aus wandern die Zellen das Epithel entlang bis sie absterben. Die Lebensdauer des Oberflächenepithels beträgt somit nur ca. 3-6 Tage.^{90, 91}

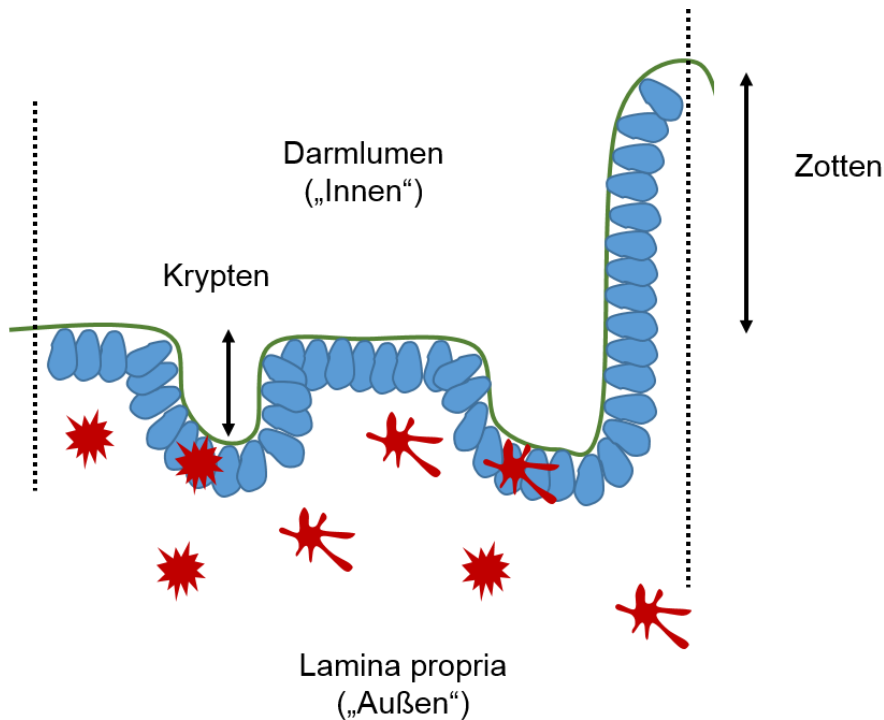


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Darmepithels und der darauffolgenden *Lamina propria*. Blau – Epithelzellen; rot – Zellen des Immunsystems.

Neben den beschriebenen Epithelzellen kommen auch M-Zellen (Mikrofaltenzellen) und einige Zellen des Immunsystems in der Darmwand vor. Hauptsächlich sind die Immunzellen jedoch in der lamina propria lokalisiert. Dabei kommen Immunzellen im Darm sowohl als verstreute lymphatische Zellen als auch in organisierten lymphatischen Geweben vor. Zu den organisierten lymphatischen Geweben gehören beispielsweise isolierte Lymphfollikel. M-Zellen kommen vor allem in den Teilen des Darmepithels vor, das die organisierten lymphatischen Gewebe vom Darmlumen abgrenzt. M-Zellen bilden keine Glykokalyx aus und sind darauf spezialisiert, Bakterien oder Viren durch Transzytose den organisierten lymphatischen Geweben zuzuführen. Über Lymphgefäße sind die organisierten lymphatischen Gewebe mit den mesenterischen Lymphknoten verbunden. Die verstreuten lymphatischen Zellen können entweder lokale Immunantworten hervorrufen oder über die Lymphgefäße zu den mesenterischen Lymphknoten gelangen.⁹²

1.3 Galenik

Der Transport von Wirkstoffen in den Darm kann sowohl oral als auch rektal erfolgen. Bei der oralen Applikation müssen die Wirkstoffe den Magen passieren. Hier herrscht ein stark saures Milieu, das Materialien und Wirkstoffe beschädigen kann. Daher müssen die Materialien bei einer oralen Applikation vor der Magensäure geschützt werden. Dies gilt auch für funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel. Diese würden sich in der Magensäure auflösen, und die Nukleinsäuren würden degradiert werden. Für eine therapeutische Anwendung von Calciumphosphat-Nanopartikeln im Darm müssen daher geeignete Darreichungsformen entwickelt werden.

Wirkstoffe können vor dem Milieu im Magen mit Überzügen geschützt werden. Eine Freisetzung in bestimmten Teilen des Darms kann vor allem pH- oder zeitabhängig erfolgen. Dabei beruht die zeitabhängige Freisetzung von Substanzen meist auf der langsamen Auflösung des Wirkstoffes oder auf der Errichtung von Diffusionsbarrieren. Die Errichtung von Diffusionsbarrieren kann dabei durch quellende Polymere erfolgen. Diese basieren zumeist auf Acrylaten oder Celluloseethern. So sind acrylatbasierte Überzüge, die wasserunlöslich sind jedoch Diffusion erlauben, in der Produktreihe Eudragit® enthalten. Da es sich bei Calciumphosphat-Nanopartikeln im Vergleich zu Molekülen um relativ große Partikel handelt, können diese quellenden Polymere jedoch keinen ausreichenden Schutz vor Säure bei gleichzeitiger Diffusion der Partikel gewährleisten.

Bei pH-sensitiven Überzügen handelt es sich um Polymere, die abhängig vom pH-Wert wasserlöslich oder wasserunlöslich sind. Dabei gibt es Polymere, die sich bei sauren pH-Werten auflösen, jedoch bei basischen pH-Werten wasserunlöslich sind. Zusätzlich gibt es Polymere, die sich entgegengesetzt verhalten. Da im Magen ein saures Milieu herrscht, während im Darm eher neutrale bis basische Bedingungen vorliegen, werden zur Freisetzung im Darm säureunlösliche Polymere verwendet. Diese beinhalten zumeist Carbonsäuregruppen, die bei basischen pH-Werten deprotoniert vorliegen. Dazu gehören unter anderem HPMCP (Hydroxypropylmethylcellulosephthalat), Carboxymethylcellulose, sowie Eudragit® L und S.⁹³ Eudragit® L und S sind auf

Acrylat basierende Kopolymere, die folgende Monomere in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander verwenden.

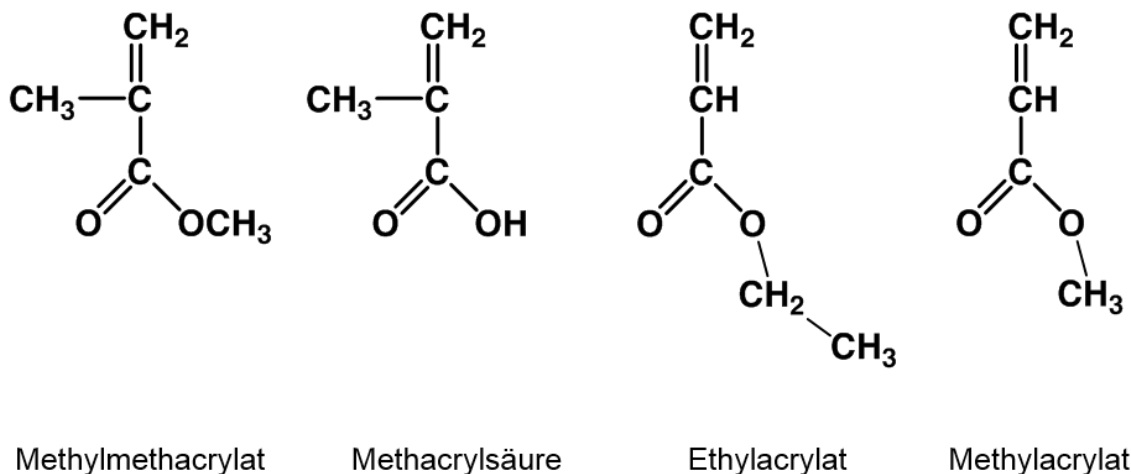


Abbildung 12: Monomere aus denen die Polymere der Eudragit® L und Eudragit® S Formulierungen bestehen.

Über das Verhältnis der Monomere kann der pH-Wert, bei dem sich das Polymer auflöst, beeinflusst werden. Zusätzlich können verschiedene Polymere gemischt werden, wodurch ebenfalls die Auflösung des Überzuges beeinflusst wird.⁹⁴

Zur rektalen Applikation können Wirkstoffe in Form von Zäpfchen verabreicht werden. Dazu werden die Wirkstoffe mit der Suppositoriengrundmasse vermischt und dann in eine bestimmte Form gebracht. Suppositoriengrundmassen können sich entweder im wässrigen Milieu auflösen oder bei Körpertemperatur schmelzen, um die Wirkstoffe im Mastdarm freizusetzen.

Wasserlösliche Zäpfchen können aus Polyethylenglykol verschiedener Molmassen hergestellt werden. Außerdem lassen sich aus Glycerol-Gelatine-Gelen wasserlösliche Zäpfchen herstellen. Zumeist bestehen Zäpfchen jedoch aus Fetten, die bei Raumtemperatur fest, bei Körpertemperatur jedoch flüssig sind. Dazu zählt das Hartfett (*adepts solidus*). Dieses besteht aus Gemischen von Mono-, Di- und Triglyceriden von gesättigten C₁₀ - C₁₈-Fettsäuren.⁹³

2 Ziel der Arbeit

Aufgrund ihrer geringen Größe können Nanopartikel von Zellen aufgenommen werden. Gleichzeitig können sie mit funktionellen Molekülen beladen werden und diese über die Zellmembran transportieren. Unter anderem können Nukleinsäuren auf diese Weise ins Zellinnere gelangen, was ohne Hilfsmittel nicht effizient möglich ist. Nanopartikel aus Calciumphosphat bieten für diese Anwendungen einige Vorteile. Calciumphosphat hat einerseits eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren. Andererseits ist Calciumphosphat biokompatibel, biodegradierbar und einfach nanopartikulär zu stabilisieren.

In dieser Arbeit sollten funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel zunächst hergestellt und charakterisiert werden. Die Nanopartikel sollten dabei mit verschiedenen Nukleinsäuren beladen werden, um die Proteinbiosynthese von Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu beeinflussen. In diesem Rahmen dienen die Nanopartikel als Transportvehikel der Nukleinsäuren über die Zellmembran. Zur Beeinflussung der Proteinbiosynthese sollten sowohl DNA als auch RNA verwendet werden. So sollte Plasmid-DNA (pDNA) die Synthese zellfremder Proteine anregen, während siRNA die Expression spezifischer Proteine herunterregulieren sollte. Sowohl die Transfektion als auch das Stummschalten spezifischer Gene bietet die Möglichkeit zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Daher sollten sowohl DNA-beladene als auch RNA-beladene Partikel vor diesem Hintergrund *in vivo* im Darm getestet werden.

Neben den Effekten der funktionalisierten Nanopartikel auf die Proteinbiosynthese sollten desweiteren Möglichkeiten zur Applikation der Partikel im Darm untersucht werden. So können Nanopartikel sowohl rektal als auch oral in den Darm gelangen. Da sich Calciumphosphat im sauren Milieu jedoch auflöst, müssen die Partikel bei einer oralen Applikation vor der Magensäure geschützt werden. Für beide Applikationswege sollten Transportvehikel entwickelt und untersucht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Transfektion mit funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln

Zunächst wurden grundlegende Studien zur Transfizierbarkeit verschiedener Zellen durchgeführt.

Für den Transport der Nukleinsäuren wurden zwei calciumphosphatbasierte Nanopartikelsorten ausgewählt und mit dem kommerziellen Transfektionsagens Lipofectamine® 2000 verglichen. Die Transfektionsagenzien sollten pDNA, die für das Protein eGFP kodierte, in die Zellen einbringen. Die Transfizierbarkeit von neun verschiedenen Zelllinien und hMSC (*human mesenchymal stem cells*) wurde getestet. Erfolgreich transfizierte Zellen waren durch ein Fluoreszenzmikroskop identifizierbar. Die Transfektionseffizienz aller Zelllinien wurde zunächst durch mikroskopische Bilder erfasst. Bei zwei Zelllinien wurde die Transfektionseffizienz anschließend mit weiteren Techniken (qPCR und FACS) untersucht. Die Toxizität bei der Transfektion wurde hierbei jeweils durch MTT-Tests bestimmt.

Anschließend wurde eine Sorte der Nanopartikel zur Transfektion von BALB/c-Mäusen eingesetzt. Die Expression von eGFP im Darm nach rektaler Applikation einer Nanopartikeldispersion wurde untersucht.

3.1.1 Charakterisierung der Nanopartikel

Die Partikel, die zur Transfektion eingesetzt wurden, wurden über eine kontrollierte Fällungsreaktion wie in Abschnitt 6.1 beschrieben synthetisiert. Es wurden zwei verschiedene Sorten Partikel verwendet, die jeweils aus mehreren Schalen aufgebaut waren. Außerdem wurde eine weitere Sorte Nanopartikel synthetisiert, die keine DNA enthielt. Diese Partikel waren mittels Fluoresceinisothiocyanat (FITC) fluoreszierend markiert. Somit konnte die Aufnahme der Partikel in Zellen verfolgt werden.

Bei den DNA-funktionalisierten Partikelsorten befand sich die DNA zum Schutz vor dem enzymatischen Abbau jeweils in einer inneren Schale.⁹⁵ Alle Partikelsorten enthielten zudem zur Stabilisierung und zur Erzeugung einer

positiven Partikelladung Polyethylenimin (PEI). Die positive Ladung der Partikel sollte den Kontakt zur negativ geladenen Zellmembran vereinfachen. Desweiteren ist PEI dafür bekannt, den Protonenschwammeffekt auszulösen, um, wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben wurde, den Austritt der DNA aus dem Lysosom zu vereinfachen. Die Partikelsorten waren schematisch von innen nach außen folgendermaßen aufgebaut:

CaP(Calciumphosphat)-DNA-CaP-PEI, CaP-PEI-DNA-SiO₂-SH und CaP-PEI(FITC)

Die Partikel wurden jeweils mittels DLS (dynamische Lichtstreuung), REM (Rasterelektronenmikroskopie), UV/Vis-Spektrometrie und AAS (Atomabsorptionsspektrometrie) eingehend charakterisiert. Die so ermittelten Eigenschaften der Partikel sind in **Tabelle 2** zusammengefasst. Die Daten in der Tabelle entsprechen hierbei den Mittelwerten aus mehreren Synthesen. **Abbildung 13** zeigt repräsentative REM-Bilder der beiden mit DNA funktionalisierten Partikelsorten und der für die Aufnahmestudien eingesetzten Partikel. Alle Partikelsorten zeichneten sich durch eine vorwiegend kugelförmige Morphologie aus. Die Größe der Primärpartikel war bei allen Nanopartikelsorten vergleichbar und bewegte sich in einem Bereich von 30 nm bis 140 nm. Diese Größenangabe stellt nicht die mittlere Größenverteilung der Partikel auf den REM-Bildern dar, sondern gibt jeweils den Größenbereich an, in dem alle Partikel vorliegen.

Desweiteren sind in **Abbildung 13** jeweils repräsentative DLS-Messkurven der Partikel abgebildet. Hierbei zeigten sich jeweils sehr breite Größenverteilungskurven. Für das CaP-PEI(FITC) System war die Messkurve multimodal. Die Messkurven verdeutlichen den polydispersen Charakter dieser Partikelsysteme, der sich zudem in den hohen PDI-Werten der Messungen äußert. Die hohe Polydispersität erschwerte jedoch die Interpretation der DLS-Daten, da große Partikel das Ergebnis bei Intensitäts-gewichteten Messungen sehr viel stärker beeinflussen als kleine.²⁰ Darin begründet sich auch der große Unterschied der Partikelgrößen in DLS und REM. Während beim REM die getrockneten Partikel abgebildet werden, misst DLS den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel in Dispersion.^{20, 96} Der Unterschied der Partikelgrößen ist jedoch durch agglomerierte Partikel in der Dispersion zu erklären, die das

Messergebnis stark beeinflussen. Da der DLS-Messung Rayleigh-Streuung zugrunde liegt, verhält sich die Streulichtintensität proportional zur sechsten Potenz des Radius eines Partikels ($I \sim r^6$). Dieser Zusammenhang verdeutlicht, dass DLS-Messungen leicht durch Agglomerate verfälscht werden können. Die DLS-Messungen zeigten dennoch, dass die Partikelsysteme zur Agglomeration neigten. Makroskopisch hingegen waren die Dispersionen als kolloidal stabil zu bezeichnen, das heißt es trat keine Sedimentation auf (> 5 h).

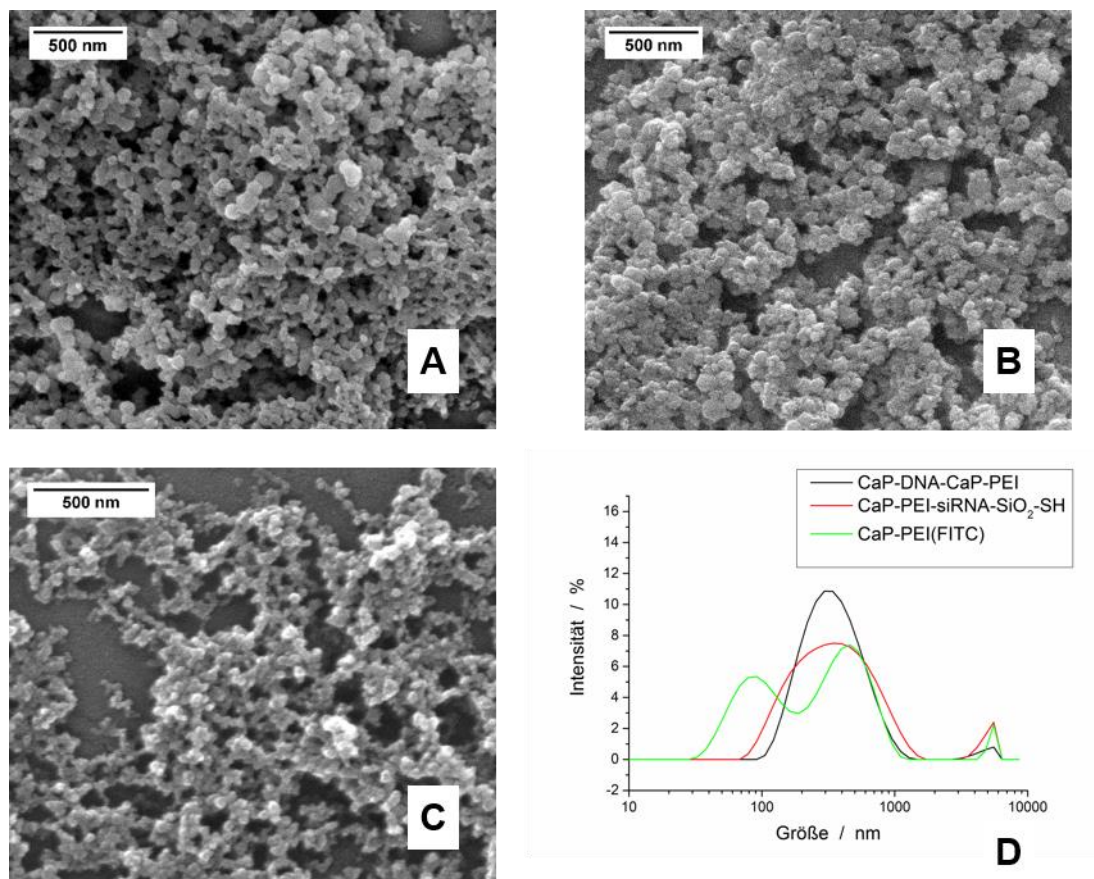


Abbildung 13: Repräsentative REM-Aufnahmen der mit Plasmid-DNA funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel(A-C); A – CaP-DNA-CaP-PEI; B – CaP-PEI-DNA-SiO₂-SH; C – CaP-FITC(PEI); D – DLS-Messkurven der jeweiligen Partikelsorten

Tabelle 2: Charakterisierung der mit Plasmid-DNA funktionalisierten Nanopartikel (\pm Standardabweichung)

	CaP-DNA- CaP-PEI	CaP-PEI-DNA- SiO ₂ -SH	CaP- PEI(FITC)
Konz. DNA / $\mu\text{g mL}^{-1}$	$11,5 \pm 2,7$	$53,9 \pm 10$	-
Größe (DLS) / nm	607 ± 295	438 ± 235	209 ± 5
Größe (REM) / nm	40-100	40-140	30-70
PDI (DLS)	0,2-0,55	0,4-0,58	0,5-0,7
Zetapotenzial / mV	20 ± 3	26 ± 8	18 ± 1
Partikelanzahl / mL^{-1}	$2,3 \cdot 10^{11}$	$7,33 \cdot 10^{10}$	$1,88 \cdot 10^{11}$
Plasmide pro Partikel	~ 8	~ 122	-

Die mittels DLS gemessenen Größenverteilungen der Nanopartikel wiesen leicht breitere Partikelgrößenverteilungen auf als ähnliche in der Literatur beschriebene Systeme.^{39, 95, 97} Die in der Literatur beschriebenen CaP-DNA-CaP-PEI-Partikel wurden jedoch nicht aufgereinigt. Somit mussten sie auch nicht mittels Ultraschall redispergiert werden, was Einfluss auf die Größe und Polydispersität der kolloidalen Dispersion nehmen kann.³³ Zum Redispergieren wurden die Partikel 10 s mit Ultraschall durch eine Sonotrode behandelt. Da Nukleinsäuren durch Ultraschall beschädigt werden können,⁹⁸ wurde darauf geachtet, diesen nur so kurz wie möglich einzusetzen. Desweiteren waren die in der Literatur beschriebenen Systeme ebenfalls polydispers, sodass auch hier auf Agglomerate geschlossen werden kann. Die REM-Daten beider Partikelsorten hingegen stimmten mit der Literatur überein.

Die positive Ladung der Partikel war auf die bei neutralem pH kationischen Aminogruppen des PEI zurückzuführen und stimmte für die Silika-beschichteten Partikel mit den Literaturdaten überein.⁹⁷ *Sokolova et al.* maßen für CaP-DNA-CaP-PEI-Partikel ein Zetapotenzial von +36 mV.³⁹ Allerdings wurden die Partikel dabei nicht aufgereinigt.

Die in **Tabelle 2** angegebenen Partikelanzahlen ergeben sich aus den Messungen zur Calciumbestimmung durch AAS. Unter der Annahme, dass bei

der Synthese stöchiometrischer Hydroxylapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, entsteht, kann unter Berücksichtigung des mittleren Radius (ermittelt aus REM-Bildern) und zu Hilfenahme von Formel (1) die Partikelanzahl berechnet werden:

$$N(\text{Partikel}) = \frac{V(\text{HAP})}{V(\text{Partikel})} = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \cdot 2,5115 \cdot 3}{\rho(\text{HAP}) 4\pi r^3} \quad (2)$$

Hierbei entspricht $[\text{Ca}^{2+}]$ der Konzentration an Calcium in der kolloidalen Dispersion in g mL^{-1} . Über den Faktor 2,5115 lässt sich die ermittelte Masse an Calcium in die Masse an Hydroxylapatit umrechnen. Durch Division mit der Dichte von Hydroxylapatit ($\rho(\text{HAP}) = 3,16 \text{ g cm}^{-3}$)²³ wird das Volumen an HAP erhalten. Das Volumen eines Partikels wird über die Formel zur Berechnung des Kugelvolumens ermittelt. **Abbildung 13** bestätigt die vorwiegend kugelförmige Morphologie der Primärpartikel der Nanopartikelsorten.

Die Berechnung der Partikelanzahl pro mL ermöglicht es in einem weiteren Schritt, die Anzahl an Plasmiden pro Partikel zu berechnen. Bei dem in diesen Experimenten verwendeten Plasmid handelte es sich um pcDNA3-eGFP, welches aus *E.coli* Bakterien isoliert wurde. Die molare Masse dieses Plasmides liegt bei $3621600 \text{ g mol}^{-1}$.⁴⁶ Da die Konzentration an DNA in der Dispersion durch UV/Vis-Messungen bekannt ist, kann die Anzahl an Plasmiden pro Partikel über Formel (2) unter Berücksichtigung der Avogadro-Konstante $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ermittelt werden:

$$N\left(\frac{\text{Plasmide}}{\text{Partikel}}\right) = \frac{[\text{DNA}]}{N(\text{Partikel}) \cdot M(\text{DNA})} \cdot N_A \quad (3)$$

Gerade die Berechnungen der Partikelanzahl in der kolloidalen Dispersion und somit auch die Berechnung der Anzahl an Plasmiden pro Partikel sind aufgrund der zugrundeliegenden physikalischen Methoden fehlerbehaftet und daher nicht mit Standardfehlern versehen. Zunächst wurde nicht untersucht, ob das Calciumphosphat in den Calciumphosphat-Nanopartikeln als Hydroxylapatit vorliegt. Falls Apatit gebildet wurde, so lag wahrscheinlich nichtstöchiometrischer Apatit vor. Außerdem ist es möglich, dass amorphes Calciumphosphat (ACP) gebildet wurde. Diese Phase wird häufig als erstes Produkt bei der Fällung von

Calciumphosphat gebildet. ACP ist jedoch thermodynamisch instabil und kann sich spontan in kristalline Calciumphosphat-Phasen umwandeln.^{23, 24, 99} Weiterhin ist es schwierig, die mittlere Größenverteilung in der kolloidalen Dispersion zuverlässig zu bestimmen. Verschiedene Techniken ergeben hierbei aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Grundlagen teilweise stark voneinander abweichende mittlere Größenverteilungen.^{100, 101} Dies findet im großen Unterschied der nach DLS und REM ermittelten Größenverteilungen Ausdruck (**Tabelle 2**). Die Berücksichtigung des mittleren Radius mit der 3. Potenz in Formel (2) verdeutlicht die Mängel der Berechnungen.

Dennoch sind die Berechnungen legitim, da sie hilfreich sind, um die Wirkungsweise der Partikel zu beschreiben und verschiedene Partikelsorten miteinander zu vergleichen. Desweiteren zeigt der Vergleich mit der Literatur, dass die Beladung an Plasmiden in der richtigen Größenordnung liegt. Aus den Berechnungen ergeben sich 8 bzw. 122 Plasmide pro Partikel. *Banik et al.* haben die Beladung von Citrat-funktionalisierten Calciumphosphat Nanopartikeln mit Lachshoden-DNA untersucht.^{36, 102} Zwar wird die Größe der DNA-Moleküle in den Studien nicht genannt, jedoch befinden sich 1-3,26 DNA-Moleküle auf einem Nanopartikel. Die dort verwendeten Partikel besaßen vor der DNA-Beladung durch die Funktionalisierung mit Citrat ein stark negatives Zetapotenzial (-23 mV)¹⁰². Die hier verwendeten Nanopartikel hingegen besaßen vor der Funktionalisierung mit Plasmiden entweder ein positives Zetapotenzial (CaP-PEI-DNA-SiO₂-SH) oder nur gering negatives Zetapotenzial (CaP-DNA-CaP-PEI),³⁸ sodass eine höhere Beladung aufgrund der elektrostatischen Interaktion zwischen DNA und Partikel Sinn macht.

3.1.2 Klassifizierung der verwendeten Zellen

Die Transfizierbarkeit von 10 verschiedenen Zelltypen wurde untersucht, um Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Mechanismen zu ziehen. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um mesenchymale Stammzellen, Epithelzellen, Fibroblasten/Osteoblasten und Monozyten.

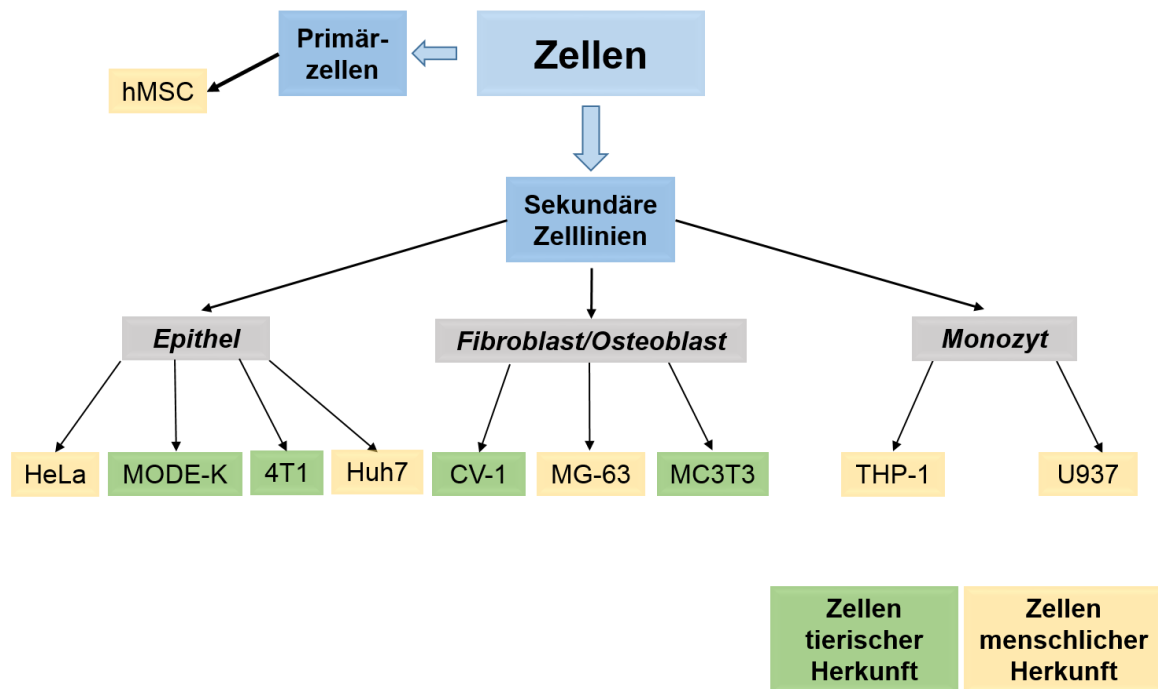


Abbildung 14: Herkunft und Klassifizierung der verwendeten Zellen.

Die Klassifizierung der verwendeten Zellen ist in **Abbildung 14** zusammengefasst. Es wird deutlich, dass ein breites Spektrum verschiedener Zellarten untersucht wurde. Die Herkunft der verschiedenen Zellarten deckte dabei eine Vielfalt an Organen ab. So wurden Gebärmutterhals- (HeLa), Darmepithel- (Mode-K), Brustdrüsen- (4T1), Leberepithel- (Huh7), Nieren- (CV-1), Knochen- (MG-63, MC3T3), Blut- (THP-1) sowie Lymphknotenzellen (U937) verwendet.¹⁰³ Die beiden Monozytenzelllinien (THP-1 und U937) wurden vor dem Experiment zu Makrophagen differenziert. Die Zellen waren sowohl tierischen als auch menschlichen Ursprungs.

3.1.3 Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln in verschiedene Zellen

Eine Voraussetzung für die Transfektion besteht in der Aufnahme von Partikeln durch die jeweiligen Zellen. Die Partikel dienen hierbei als Transportvehikel für die DNA über die Zellmembran. Desweiteren beschleunigen sie aufgrund ihrer Zusammensetzung den Austritt der DNA aus den Lysosomen. Ist die DNA im Zytosol, so muss sie für eine erfolgreiche Transfektion noch in den Zellkern gelangen.

Die Aufnahme von fluoreszierenden Nanopartikeln durch Zellen lässt sich im Fluoreszenzmikroskop visualisieren. Daher wurden CaP-Nanopartikel synthetisiert, die mit FITC-PEI funktionalisiert waren. Das FITC war kovalent an das PEI gebunden und diente als Fluoreszenzmarker. Das PEI sorgte für die kolloidale Stabilisierung und eine positive Partikelladung. Aufgrund der gleichen Ladung und einer ähnlichen Oberflächenfunktionalisierung sollte die Interaktion dieser Partikel mit Zellen vergleichbar mit der Interaktion von DNA-funktionalisierten CaP-DNA-CaP-PEI-Partikeln mit Zellen sein. Auch die CaP-PEI-DNA-SiO₂-SH-Partikel sind positiv geladen und liegen laut REM in der gleichen Größenordnung vor.

Die Charakterisierung dieser Partikel ist in **Tabelle 2** zusammengefasst. Die Aufnahmestudien wurden mit Partikeln aus derselben Synthese durchgeführt. Somit konnten Variationen verschiedener Partikelchargen ausgeschlossen werden. Da diese Partikel nur einmal synthetisiert wurden, beziehen sich die Fehler dieser Partikelsorte auf verschiedene Messungen derselben Partikel. Alle anderen Fehler beziehen sich auf Variationen verschiedener Partikelchargen.

Die Aufnahme der Calciumphosphat-Nanopartikel durch die verschiedenen Zelltypen ist in **Abbildung 15** dargestellt. Die grüne Fluoreszenz des Moleküls ist in **Abbildung 15** farblich ebenfalls grün gekennzeichnet. Aus den Aufnahmen wird deutlich, dass die Partikel von allen Zelltypen aufgenommen wurden. Quantitative Aussagen lassen sich hierbei allerdings nicht treffen. Zum einen wurde die Aufnahme der Partikel nach nur einem Zeitpunkt ausgewertet. Unterschiedliche Zelltypen können die Partikel jedoch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten aufnehmen. Zum anderen hängt die Sichtbarkeit der Partikel mit der Belichtungszeit zusammen. Die Belichtungszeit muss jedoch für jedes Bild individuell angepasst werden, um agglomerierte Partikel nicht zu stark

anzuregen. Desweiteren kann die Dicke des *well*-Bodens unterschiedlich sein und dadurch Einfluss auf die Lichtexposition der Partikel nehmen. Die Bilder sollten also rein qualitativ bewertet werden, auch wenn der Eindruck entsteht, dass einige Zelltypen mehr Partikel aufnehmen als andere.

Mit den fluoreszenzmikroskopischen Bildern der Partikelaufnahme kann die Lokalisation der Partikel innerhalb der Zelle aufgrund der zu schwachen Auflösung nicht bewiesen werden. Jedoch wurden die Zellen nach 3 h Inkubation mit den Nanopartikeln ausgiebig gewaschen, um Partikel außerhalb der Zellen zu entfernen. Da außerhalb der Zellen kaum Partikel zu finden sind, ist davon auszugehen, dass die Partikel entweder schon aufgenommen wurden oder eine starke Interaktion zwischen Zellmembran und Partikel stattfand. Solch eine starke Interaktion würde dann auch zur Aufnahme der Partikel führen. Eine bessere Lokalisation von Partikeln innerhalb von Zellen wird durch konfokale Laser-scanning-Mikroskop (CLSM – *confocal laser scanning microscope*) ermöglicht. Die Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln konnte mittels CLSM in HeLa Zellen,⁷³ T-Huvec Zellen,⁵⁶ HepG2 Zellen,¹⁰⁴ und NIH3T3 Zellen gezeigt werden.¹⁰⁵ Die Aufnahme fand hierbei jeweils innerhalb einiger Stunden statt. Als Aufnahmerouten von Calciumphosphatpartikeln wurden sowohl Makropinozytose als auch clathrin- und caveolaeabhängige Endozytose postuliert.^{72, 73}

Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit M.Sc. Olga Rotan und B.Sc. Benjamin Tosun durchgeführt.

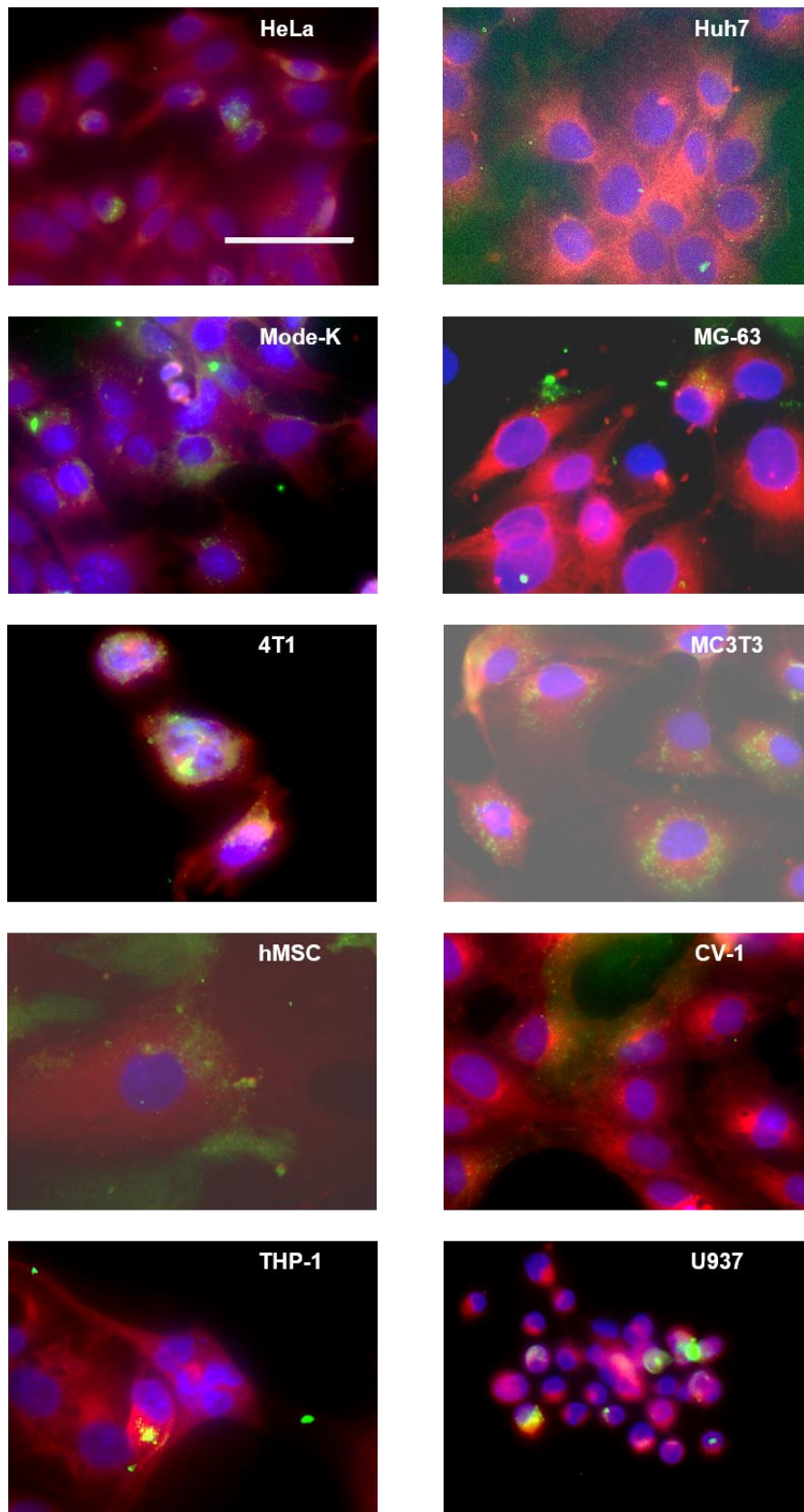


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Aufnahme von CaP-PEI(FITC) Partikeln (grün) durch verschiedene Zelltypen. Die Zellmembran wurde mit CellMask® gefärbt (rot); die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Die Skala entspricht 50 µm, Vergrößerung: 100x.

3.1.4 Transfektion *in vitro*

Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, führt die Partikelaufnahme nicht zwangsläufig zur Transfektion der Zellen. So muss nach dem Austritt der DNA aus den Lysosomen noch der Transport über die Kernmembran gewährleistet sein. Im Kern muss dann das intakte Plasmid transkribiert werden, sodass Proteine exprimiert werden können.

Da die Partikel von allen Zelltypen aufgenommen wurden, konnten im nächsten Schritt Calciumphosphat-Nanopartikel mit pDNA funktionalisiert werden. Die Untersuchung der Expression des vom Plasmid kodierten Proteins erlaubt dann Rückschlüsse auf die Transfizierbarkeit der Zellen und den Verbleib des Plasmids in der Zelle. Die pDNA kodiert für die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP), sodass transfizierte Zellen grün dargestellt werden konnten. Die zur Transfektion einzusetzende Menge an Nanopartikeln wurde auf die Menge an DNA normiert. So wurde allen Zelltypen dieselbe Menge an DNA pro *well* mittels Nanopartikeln appliziert. Da beide Nanopartikelsorten mit unterschiedlich vielen Plasmiden pro Partikel funktionalisiert waren, führt dies zu einer unterschiedlichen Anzahl an Nanopartikeln (und Mengen an Calcium, PEI etc.), die pro Sorte zu den Zellen gegeben wurde. So wurden etwa $7,97 \cdot 10^9$ CaP-DNA-CaP-PEI-Partikel und $1,31 \cdot 10^9$ CaP-PEI-DNA-SiO₂-SH-Partikel pro *well* verwendet. Lipofectamine® wurde nach Empfehlungen des Herstellers verwendet.¹⁰⁶ Daher wurde hier weniger DNA pro *well* zu den Zellen gegeben. Alle Zellen sollten parallel jeweils mit derselben Charge Nanopartikel transfiziert werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Hierdurch ließen sich Schwankungen der Partikeleigenschaften unterschiedlicher Synthesen sowie Unterschiede im Verhalten von Zellen unterschiedlicher Passagen minimieren. Um die benötigte Menge an DNA zu verringern, wurden die Zellen in 96er *well*-plates ausgesät. Somit wurden pro *well* 0,3 µg DNA mittels Nanopartikel verabreicht, während bei Lipofectamine nur 0,2 µg pro *well* verwendet wurden.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie lassen sich transfizierte und nicht transfizierte Zellen voneinander unterscheiden. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Bilder von Zellen, die mit CaP-DNA-CaP-PEI-Partikeln transfiziert wurden, sind in **Abbildung 16** und **Abbildung 17** gezeigt.

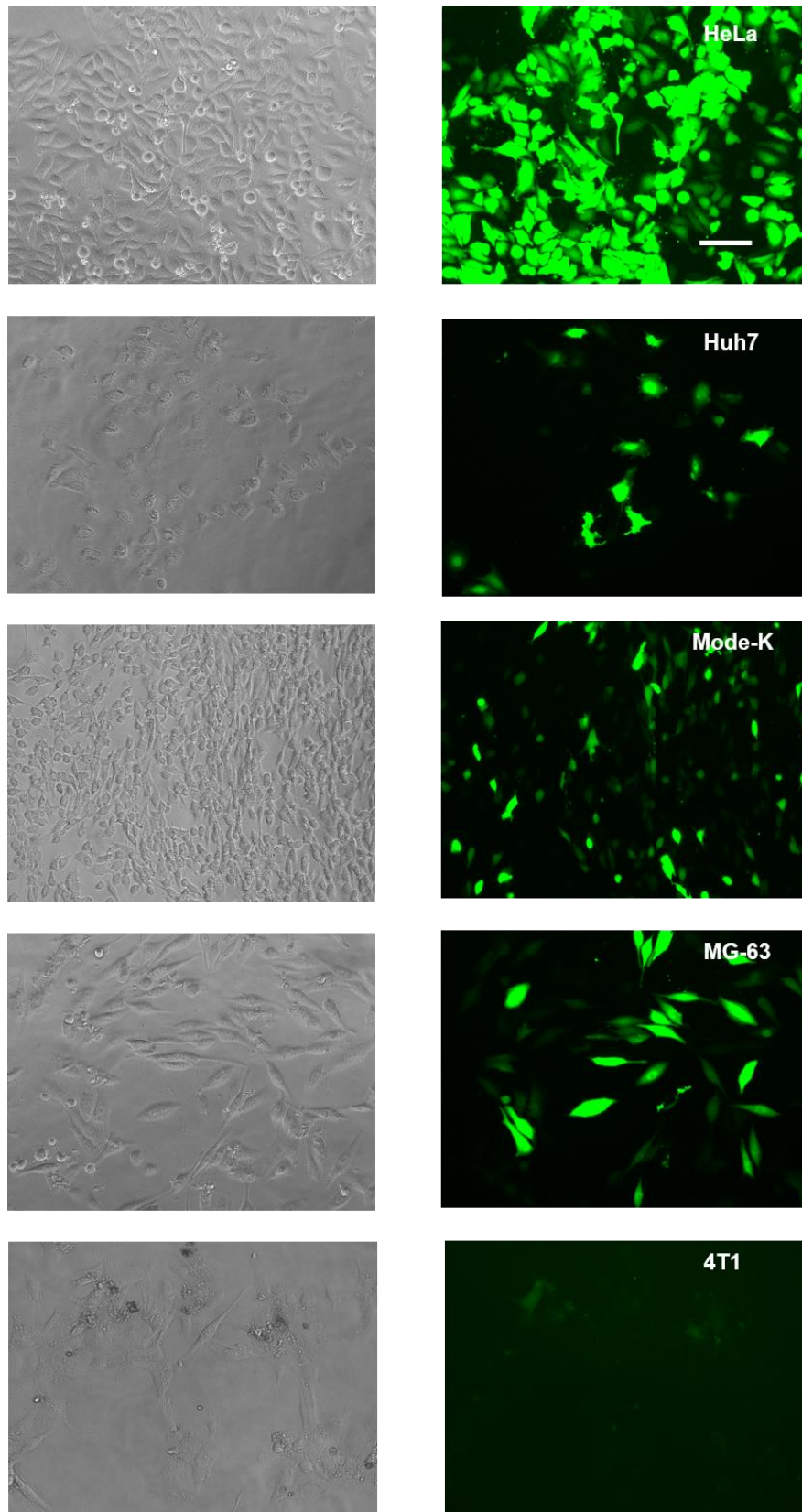


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen von Zellen nach der Transfektion mit CaP-DNA-CaP-PEI-Partikeln. Links: Lichtbilder Rechts: Fluoreszenzbilder. Die Skala entspricht 100 μm , Vergrößerung: 20x.

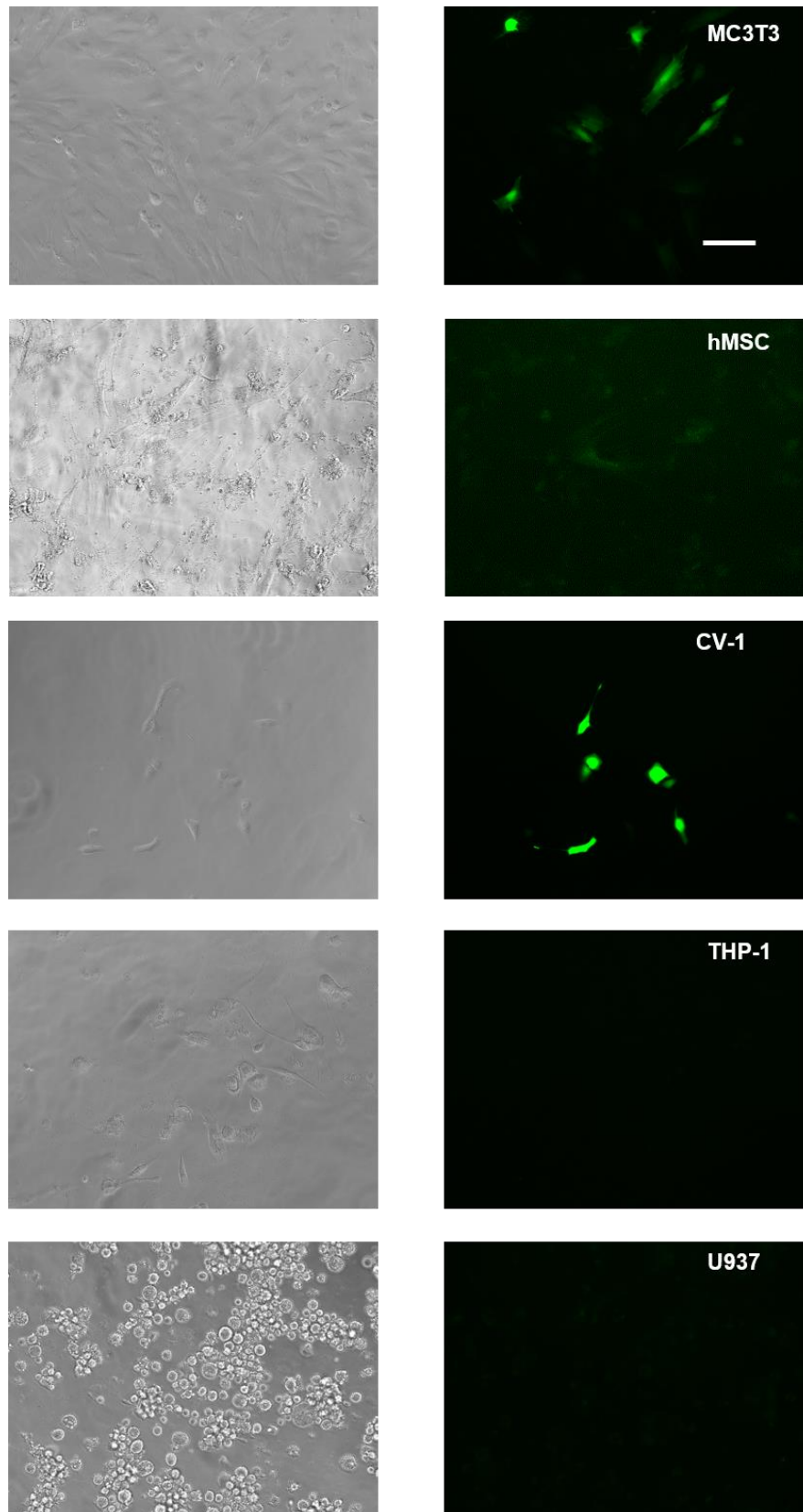


Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahmen von Zellen nach der Transfektion mit CaP-DNA-CaP-PEI-Partikeln. Links: Lichtbilder Rechts: Fluoreszenzbilder. Die Skala entspricht 100 μm , Vergrößerung: 20x.

Die quantitative Auswertung der Transfektion erfolgte durch Auszählen der Zellen auf den licht- sowie den fluoreszenzmikroskopischen Bildern. Da auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern nur die transfizierten Zellen zu sehen sind, ergibt sich nach Formel (9) aus dem Quotienten beider Zellzahlen die Transfektionseffizienz in %. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 18** dargestellt.

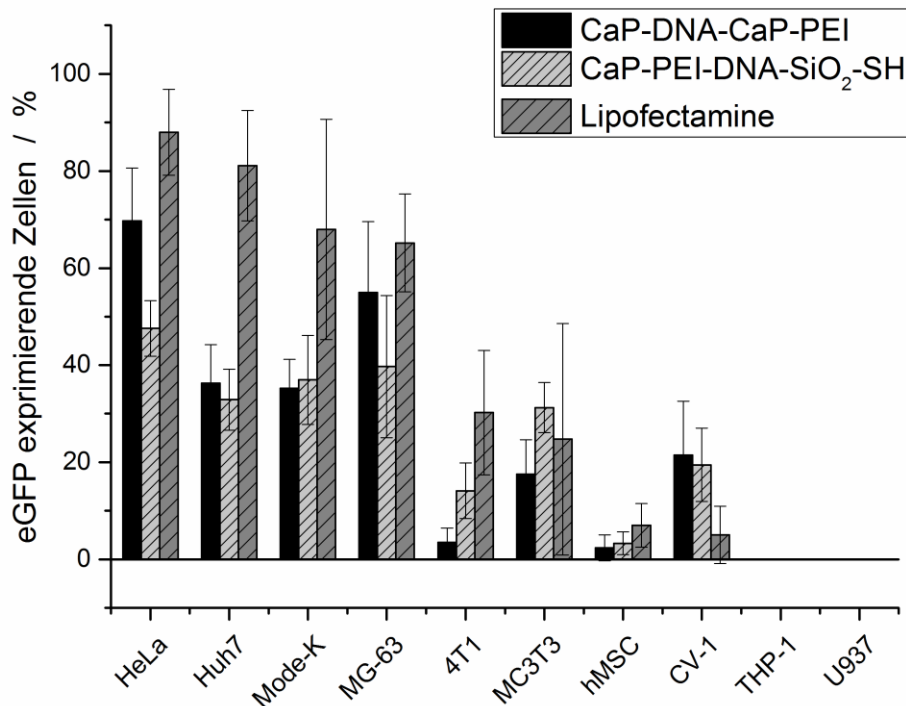


Abbildung 18: Transfektionseffizienz der Calciumphosphat Nanopartikel und Lipofectamine in unterschiedlichen Zelllinien und hMSC. Pro *well* (96er *well-plate*) wurden 0,3 µg DNA mit Nanopartikeln appliziert, mit Lipofectamine® 2000 wurden 0,2 µg DNA verabreicht. (± Standardfehler)

Die quantitative Auswertung der Transfektionsergebnisse bestätigte, was auch schon in **Abbildung 16** und **Abbildung 17** qualitativ gezeigt wurde. So ließen sich einige Zellen mit allen Transfektionsagencien sehr gut (HeLa, Huh7, Mode-K, MG-63) transfizieren, während sich manche nur schlecht (4T1, MC3T3, hMSC, CV-1) oder gar nicht (THP-1, U937) transfizieren ließen. Lipofectamine® transfizierte die Zellen allgemein am effizientesten, jedoch wurden auch mit beiden Nanopartikelsorten ähnlich gute Transfektionseffizienzen erzielt. Unabhängig vom Transfektionsagenc waren die gut transfizierbaren Zellen hauptsächlich diejenigen, die sich auch schnell teilten. Eine Ausnahme bildeten

hier CV-1- und MC3T3-Zellen, die sich ebenfalls schnell teilten, allerdings nicht mit allen Transfektionsagenzien gut transfizierbar waren.

Die Abhängigkeit von Transfektion und Zellteilung wurde in der Literatur von unterschiedlichen Gruppen beschrieben.^{58, 107, 108} Im Gegensatz zur Genstummschaltung muss die Plasmid-DNA bei der Transfektion in den Zellkern gelangen. Der Eintritt der DNA in den Kern kann über den Zusammenbruch der Kernmembran während der Mitose^{109, 110} vereinfacht werden. Durch *life cell imaging* konnte sowohl von *Hakamada et al.* als auch von *Kirchenbuechler et al.* gezeigt werden, dass HeLa-Zellen transfizierte Plasmide hauptsächlich nach der Zellteilung exprimieren.^{107, 108} Unabhängig vom Transfektionsagens wurde der Eintritt der DNA in den Kern nach der Zellteilung von *Hakamada et al.* als geschwindigkeitsbestimmender Schritt bei der Transfektion identifiziert. Unter anderem wurden hierbei Lipofectamine® und PEI-basierte Transfektionsagenzien untersucht. Dennoch hängt die Expression eines transfizierten Proteins nicht ausschließlich mit der Zellteilung zusammen.^{108, 111}

Die Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen schnell proliferierenden Zellen und nicht proliferierenden Zellen lassen sich somit erklären, jedoch bleibt unklar, wieso zwei Zelllinien gar nicht transfiziert wurden. Die einzigen nicht transfizierten Zelllinien sind Monozytenzelllinien, die zu Makrophagen differenziert wurden. Diese Zelllinien werden auch in der Literatur als schwer transfizierbar beschrieben.^{112, 113} Der Grund für die schlechte Transfizierbarkeit von Makrophagen liegt wahrscheinlich an anderen Aufnahmewegen der Partikel. So handelt es sich bei Makrophagen um Zellen, die in den Organismus eindringende fremde Mikroorganismen durch Phagozytose aufnehmen und zerstören können. Dafür benötigen sie verdauungsaktive Enzyme. Es ist daher denkbar, dass Makrophagen die Partikel durch Phagozytose aufnehmen und die Nukleinsäuren im Phagolysosom abbauen.^{92, 112}

Neben der Transfektionseffizienz wurde die Toxizität der Partikel für jede Zelllinie mittels MTT-Test bestimmt. Der MTT-Test ermöglicht es, über UV/Vis-spektrometrische Messungen die Anzahl der Zellen mit einer Kontrolle zu vergleichen. Dazu wird MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu den Zellen gegeben. Dieses wird ausschließlich von lebenden Zellen zum Formazanderivat umgesetzt. Dieses ist im Gegensatz zu MTT wasserlöslich und absorbiert Licht bei 570 nm. Die Menge an

entstandenem Formazan korreliert mit der Anzahl der lebenden Zellen. Der Quotient der Absorptionen spiegelt das Verhältnis der Anzahl von unbehandelten Kontrollzellen und Zellen eines Experiments in % wider. Die Ergebnisse der Toxizitätsmessungen sind in **Abbildung 19** zusammengefasst.

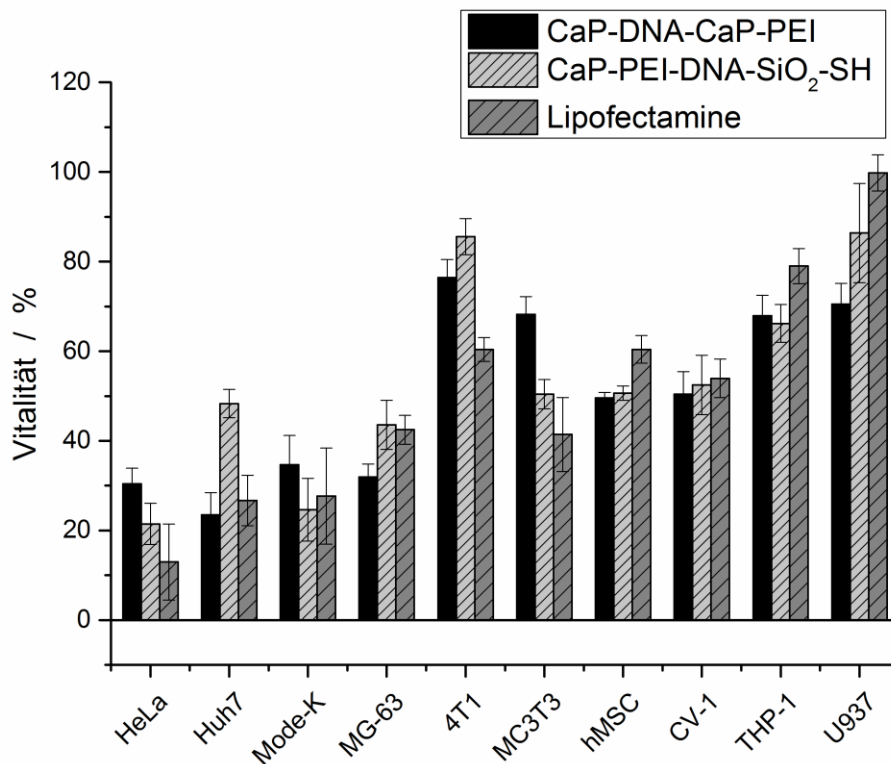


Abbildung 19: Ergebnisse der MTT-Tests für jede Zelllinie. Die Vitalität in % wurde auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen normiert. Pro *well* (96er *well-plate*) wurden 0,3 µg DNA mit Nanopartikeln appliziert, mit Lipofectamine® 2000 wurden 0,2 µg DNA verabreicht. (± Standardfehler)

Wie schon bei der Transfektion fällt auch bei der Vitalität auf, dass einige Zellen weniger empfindlich auf die Transfektion reagierten, während andere Zellen recht empfindlich waren. Allerdings waren nun die Zellen, die sich gut transfizieren ließen, auch diejenigen, die sehr empfindlich reagierten. Wie schon die Transfektionseffizienz war auch die Toxizität aller Transfektionsagenzien vergleichbar.

Sowohl Nanopartikel als auch Lipofectamine® enthalten positiv geladene Gruppen, die für ihre toxischen Nebenwirkungen bei der Transfektion bekannt sind. Der Grund für die Toxizität von positiv geladenen Liposomen und Lipoplexen ist bisher nicht bekannt, wird jedoch hauptsächlich auf die positiv

geladenen Kopfgruppen der Lipide zurückgeführt. Die positiv geladenen Kopfgruppen bestehen zumeist aus primären, sekundären, tertiären oder quaternären Aminen. Hierbei sind quaternäre Amine toxischer als tertiäre. Die Toxizität konnte außerdem durch Gruppen verringert werden, die eine delokalisierte positive Ladung trugen.^{114, 115}

Die Toxizität von PEI hängt von vielen Faktoren ab, unter anderem dem Molekulargewicht und der Struktur des Polymers. Außerdem kann PEI sowohl intrazellulär als auch extrazellulär toxisch wirken.^{116, 117} Intrazelluläres PEI kann sich vom Komplex mit der DNA lösen und intrazelluläre Prozesse stören. Neben der Aktivierung apoptotischer Signalwege kann dies zum Schrumpfen der Zelle, sowie zu verminderten Proliferationsraten führen.^{111, 114, 116, 117}

Neben den kationischen Bestandteilen kann im Falle der Partikel ebenfalls eine kritische Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Ca^{2+} zum Zelltod führen. Unterschiedliche Zelltypen reagieren hierbei mit unterschiedlicher Sensibilität auf die Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln. Während vaskuläre glatte Muskelzellen schon auf geringe Konzentrationen ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CaP) an unfunktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln aufgrund von erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sensitiv reagieren, sind andere Zelltypen robuster.^{118, 119} Eine konzentrationsabhängige Toxizität wurde ebenfalls bei primären menschlichen Makrophagen, sowie MCF-7-Zellen festgestellt. Jedoch konnte bei diesen Zellen bei $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ an CaP nur geringe Toxizität festgestellt werden.^{120, 121} Hierbei konnte die toxische Wirkung auch mit der unterschiedlichen Aufnahme von verschiedenen CaP-Partikeln korreliert werden. Dies verdeutlicht die Schwierigkeiten beim Vergleich der Daten mit der Literatur. Die Transfektion von T24-Zellen mit negativ geladenen und DNA-funktionalisierten CaP-Partikeln bei geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen ($4,2 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ca}^{2+} \triangleq 10,5 \mu\text{g mL}^{-1} \text{CaP}$) zeigte keine toxischen Auswirkungen. Die Zellen konnten hierbei die Erhöhung an intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration durch Ca^{2+} -Pumpen verhindern.¹²² Ebenso konnten H460-Zellen eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Inkubation mit Lipid-Calciumphosphat Nanopartikeln ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) durch Ca^{2+} -Pumpen kompensieren.¹²³ In HepG2- und L929-Zellen zeigten CaP-Nanopartikel selbst bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ noch keine toxischen Auswirkungen.¹⁰⁴ Höhere Dosen führten dennoch zu Toxizität, die die Autoren dieser Studie auf die Degradation der

Lysosomen zurückführten. Die Zerstörung der Lysosomen führte zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, die dann zur Zellnekrose führten.

Die Menge an Calcium, mit der Zellen in diesen Studien inkubiert wurden entspricht im Fall der CaP-DNA-CaP-PEI-Partikel $52 \mu\text{g mL}^{-1}$ HAP bzw. $21 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Ca}^{2+}$.

Viele Bestandteile der Transfektionsagenzien können also toxisch wirken. Dennoch reagierten die gut transfizierten Zellen empfindlicher als die schlecht transfizierten Zellen. Eine der Studien hat das Platzen der Lysosomen als Ursache der Toxizität identifiziert.¹⁰⁴ Außerdem wurde für kationische Liposome festgestellt, dass diese in Verbindung mit pDNA toxischer waren als ohne pDNA.¹²⁴ Dies spricht für komplexe Zusammenhänge, die die Toxizität während der Transfektion beeinflussen. Andererseits ist die Freisetzung der DNA aus den Lysosomen eine Voraussetzung zur Transfektion. Unabhängig vom Transfektionsagenz deutet sich ein Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz und Vitalität der Zellen an, der in **Abbildung 20** illustriert ist.

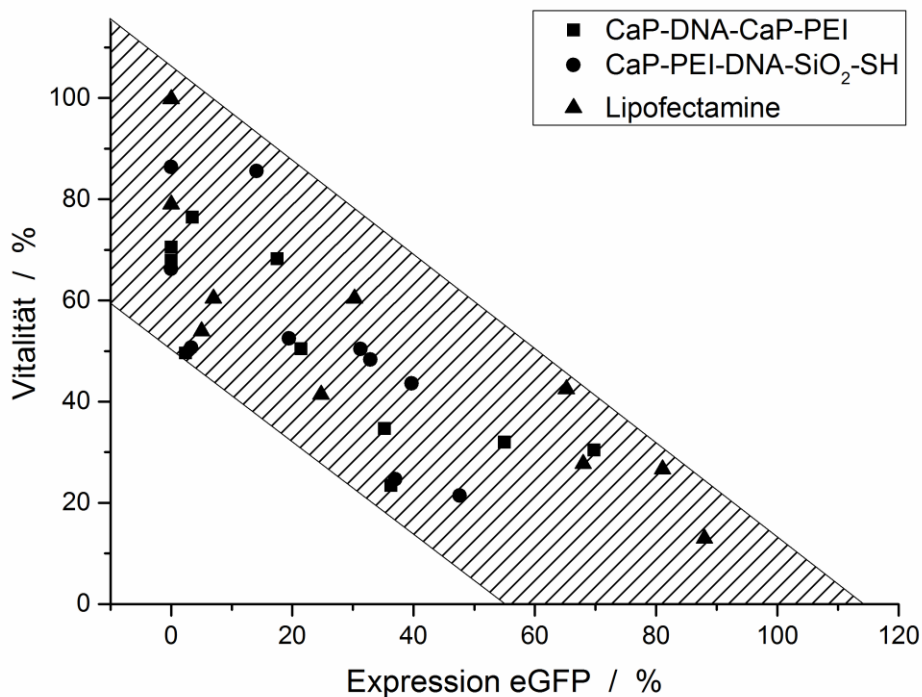


Abbildung 20: Auftragung der Transfektionseffizienz (Expression eGFP) gegen die Vitalität der Zellen.

Die Abbildung verdeutlicht, dass Zelltypen, die besser transfiziert wurden auch geringere Vitalität aufwiesen. Einen ähnlichen Zusammenhang haben *King et al.* bei der Transfektion von hMSC gefunden. Hier wurde weiterhin ein Einfluss der Anzahl an vorherigen Zellpassagen auf die Transfektionseffizienz gefunden. Außerdem waren proliferierende hMSC leichter zu transfizieren.¹²⁵

Die Korrelation beweist natürlich nicht, dass die Ursache der Toxizität in der guten Transfektionseffizienz liegt. Dennoch wird angedeutet, dass ein gemeinsamer Parameter existiert. So bewirken sowohl die kationischen Polymere und Lipide, durch Auslösen des Protonen-Schwamm-Effektes, als auch das Calciumphosphat, durch Erhöhung des osmotischen Drucks, die Freisetzung der Biomoleküle in das Zytosol. Einerseits ist die Freisetzung eine Voraussetzung für die Transfektion, andererseits können die freigesetzten Stoffe über die oben beschriebenen Signalwege toxisch auf die Zellen reagieren. Dennoch ist der gemeinsame Parameter, falls existent, bisher unbekannt.

Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit M.Sc. Olga Rotan und B.Sc. Benjamin Tosun durchgeführt.

Die Auswertung der Transfektionsergebnisse mittels mikroskopischer Bilder ermöglicht es, die Transfektion auf Proteinebene zu erfassen. Jedoch leuchten einige Zellen stärker grün als andere. Dies könnte daran liegen, dass einige Zellen mehr Plasmide aufnehmen als andere oder früher transfiziert wurden und somit mehr Zeit hatten, eGFP zu synthetisieren. Desweiteren spielen die Belichtungszeit und die Fokusebene der Zellen eine Rolle. Zudem wird durch die mikroskopischen Bilder immer nur ein Teil der Zellen eines *well*s abgebildet, was es erschwert, statistisch umfangreiche Daten zu erhalten.

Neben der Auswertung mikroskopischer Bilder lässt sich die Expression von eGFP durch qPCR und FACS untersuchen. Beim FACS werden die Fluoreszenzeigenschaften von eGFP ausgenutzt, um einerseits eGFP produzierende Zellen von nicht-transfizierten zu unterscheiden. Andererseits kann über die mittlere Fluoreszenzintensität unter Umständen die absolute Menge an eGFP pro Zelle verglichen werden.

Die qPCR kann die Transfektionseffizienz auf mRNA-Ebene untersuchen. Hierdurch wird die Menge an proteinspezifischer mRNA pro *well* bestimmt und auf die Zellzahl normiert.

Beide Techniken ermöglichen es, die Expression an eGFP von großen Zellzahlen zu untersuchen, was die statistische Relevanz der Daten verbessert. Gleichzeitig lässt sich die Menge an Protein jeweils auf die Zellzahl normieren.

Die Analyse der Expression an eGFP mittels FACS und qPCR wurde nur an zwei Zelllinien durchgeführt. Am relevantesten für diese Arbeit waren dabei HeLa-Zellen und Mode-K-Zellen. HeLa-Zellen sind relevant, da diese Zelllinie in Verbindung mit den CaP-Partikeln am eingehendsten charakterisiert ist. Mode-K-Zellen dienen als Modell für die Darmepithelfunktion und sind somit im Kontext der Eigenschaften von CaP-Partikeln im Darm relevant.

Die Transfektion dieser beiden Zelllinien wurde in 24er *well-plates* durchgeführt und mit einer anderen Charge an Nanopartikeln, die im Rahmen der Standardabweichung den Charakterisierungen in **Tabelle 2** entsprachen. Außerdem wurden andere Zellpassagen als in den vorherigen Experimenten verwendet. Hierbei wurden mit den Nanopartikeln jeweils 2 µg DNA pro *well* appliziert. Mit Lipofectamine® wurden nur 0,8 µg DNA pro *well* appliziert.

Die Ergebnisse der Analyse mittels qPCR und FACS sind in **Abbildung 21** und **Abbildung 22** wiedergegeben.

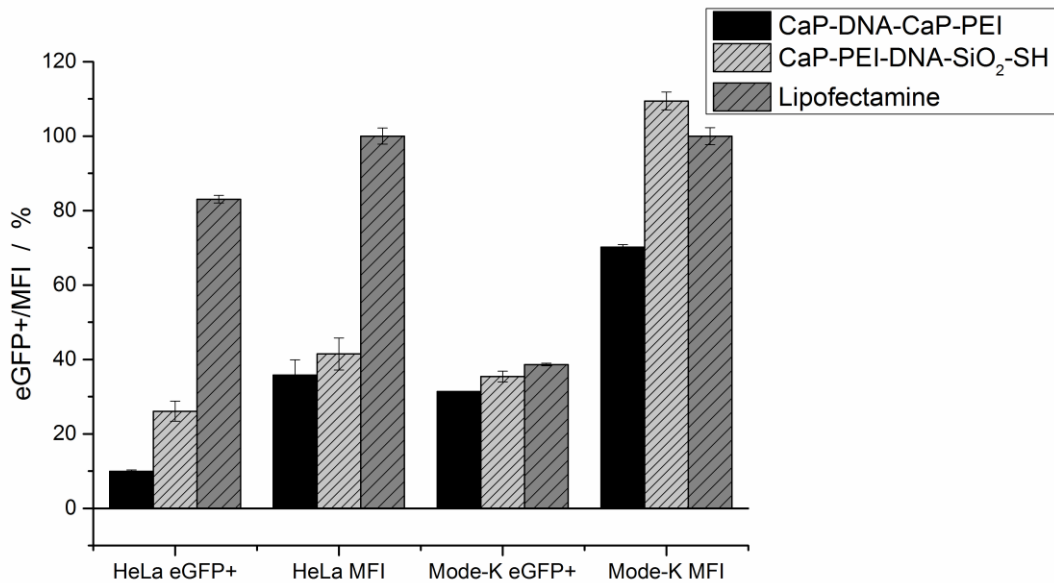


Abbildung 21: Ergebnisse der FACS-Analyse nach der Transfektion von Zellen mit eGFP. Aufgetragen ist der Anteil der eGFP-produzierenden Zellen (eGFP+) in % an allen lebendigen Zellen. Der MFI ist die mittlere Fluoreszenzintensität aller eGFP+ Zellen. Der MFI der mit Lipofectamine® transfizierten Zellen wurde jeweils auf 100 % gesetzt, sodass die MFIs der Partikel auf Lipofectamine® normiert wurden. (± Standardfehler)

Die Auswertung mittels FACS stimmte gut mit den aus den mikroskopischen Bildern gewonnenen Ergebnissen überein. Unterschiede lagen bei HeLa-Zellen für die Partikelsorten und bei Mode-K-Zellen für Lipofectamine® vor. Dies kann mit der Verwendung unterschiedlicher Zellpassagen zusammenhängen.¹²⁵ Deutlich wurde auch, dass Zellen, die eine ähnliche Ausbeute an transfizierten Zellen aufwiesen (eGFP+), auch ähnlich stark eGFP produzierten (MFI). So produzierten etwa 80 % der HeLa-Zellen nach Transfektion mit Lipofectamine® eGFP, während die Partikel nur etwa 10-30 % der Zellen transfizierten. Gleichzeitig wiesen die von Lipofectamine transfizierten Zellen einen in etwa 2,5fach höheren MFI auf, während die Werte für die Partikelsorten in etwa gleich waren. Mode-K-Zellen wurden von allen Transfektionsagencien gleich gut transfiziert und wiesen auch ähnliche MFIs auf. Es war allerdings unbekannt, ob das Fluoreszenzsignal von eGFP ab einer bestimmten Konzentration an Protein gequencht wurde und so nicht mehr linear zur tatsächlich vorhandenen Menge an eGFP korreliert werden konnte. Zudem können unterschiedliche Größen von Zellen die Korrelation zwischen MFI und Proteinmenge pro Zelle erschweren. Auf mRNA-Ebene konnte die Menge des Proteins jedoch über qPCR bestimmt

werden, ohne das Fluoreszenzsignal von eGFP auszunutzen. Allerdings wird hierbei auf die Gesamtzellzahl (transfizierte und nicht-transfizierte Zelle) normiert, sodass nur die Menge an eGFP pro Zellzahl, nicht aber die Menge an eGFP pro transfizierter Zelle miteinander verglichen werden konnte.

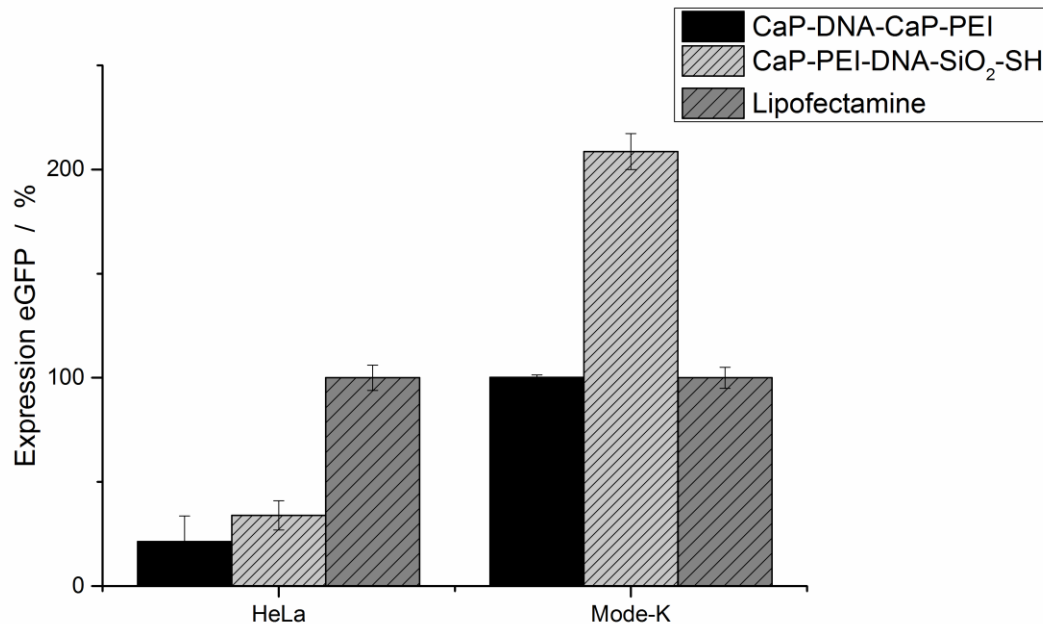


Abbildung 22: Auswertung der qPCR nach der Transfektion. Alle Werte wurden auf Lipofectamine normiert. (\pm Standardfehler)

Ähnliche Ergebnisse wie durch die FACS-Analyse wurden auch durch qPCR-Analyse erhalten. Lediglich die Mode-K-Zellen wiesen durch qPCR eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz durch CaP-PEI-DNA-SiO₂-SH-Partikel auf als durch die anderen Transfektionsagenzien und unterscheiden sich so von den FACS-Ergebnissen. Die Proteinexpression wurde allerdings durch beide Techniken auf unterschiedlichen Ebenen untersucht. Es ist also unklar ob physikalische Grundlagen (Quenching) oder biologische Prozesse für diesen Unterschied verantwortlich waren. Dennoch ließ sich die Transfektion mit den Techniken in beiden Zelllinien deutlich nachweisen und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Die Vitalität der Partikel wurde wiederum mittel MTT-Test erfasst (**Abbildung 23**).

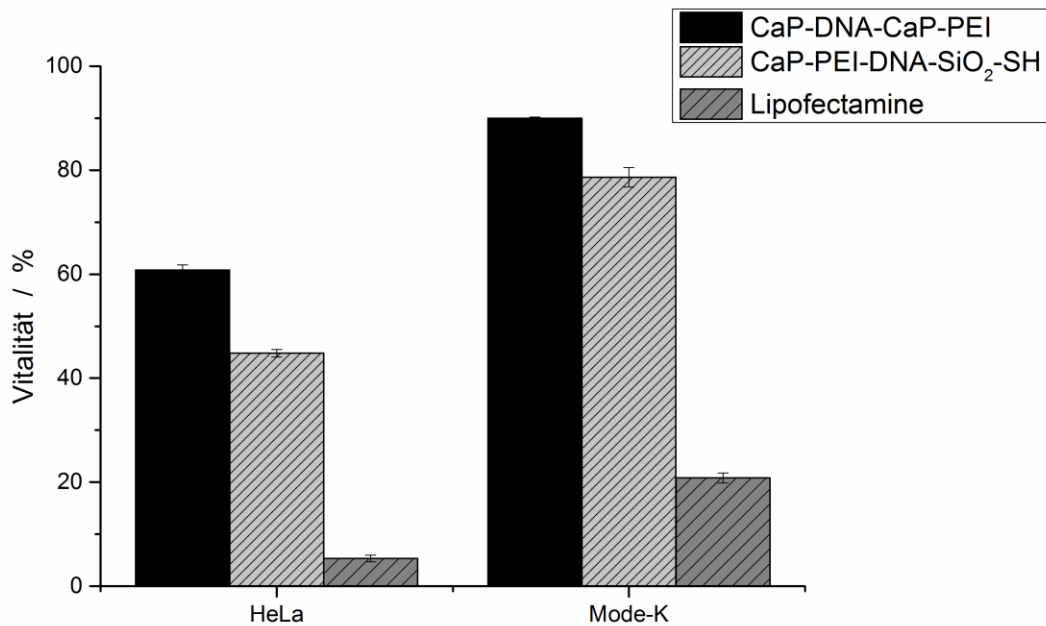


Abbildung 23: Vitalität der mittels FACS und qPCR untersuchten Zellen. Die Vitalität wurde mittels MTT-Test gemessen. (\pm Standardfehler)

Die Korrelation der Transfektionsergebnisse (eGFP+ aus FACS) mit der mittels MTT-Test erfassten Toxizität ließ sich für die HeLa-Zellen gut in die in **Abbildung 20** aufgetragene Korrelation einordnen. Bei den Mode-K Zellen waren die Datenpunkte für die Nanopartikelsorten jeweils über dem oberen Rand der schraffierten Fläche zu finden. Jedoch lagen beide Punkte nur knapp außerhalb der Fläche. Lipofectamine® hingegen war auch bei den Mode-K Zellen innerhalb der schraffierten Fläche. Da FACS die Fluoreszenz einzelner Zellen erfasste, ist es denkbar, dass schwächer transfizierte Zellen als eGFP+ wahrgenommen wurden. Diese wurden beim Auswerten der mikroskopischen Bilder unter Umständen übersehen (beispielsweise falls sie direkt an stark fluoreszierende Zellen angrenzten), sodass die Korrelation für die mittels FACS ausgewertete Transfektion etwas geändert werden müsste. Generell stimmten die Daten für die mikroskopisch ausgewertete Transfektion jedoch relativ gut mit den FACS- oder qPCR-Daten überein, obwohl unterschiedliche Zellpassagen und Partikelchargen verwendet wurden.

Sowohl die FACS-Analyse als auch die qPCR wurde von M.Sc. Annika Frede durchgeführt.

3.1.5 Transfektion *in vivo*

Die *in vitro*-Versuche haben gezeigt, dass viele Zelllinien durch beide Partikelsorten transfizierbar waren. Die Transfektion ließ sich sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene nachweisen. Nun sollte die Transfektion *in vivo* nachgewiesen werden. Da die CaP-DNA-CaP-PEI-Partikel tendenziell etwas weniger toxisch waren, wurden *in vivo* nur diese Partikel getestet. Die Transfektionseffizienz der Nanopartikel wurde wiederum mit der von Lipofectamine® verglichen. Als Modell wurden hierbei Mäuse des Stammes BALB/c genutzt. Die Nanopartikel wurden bei diesen Experimenten rektal als Dispersion in den Darm appliziert. Für die Transfektion mit Nanopartikeln wurden je 50 µg an DNA pro Maus injiziert. Das Volumen pro Injektion betrug 100 µL. Eine entsprechende Menge gefriergetrockneter Nanopartikel wurde in diesem Volumen redispergiert, um die DNA zu injizieren. Der Darm wurde für die Untersuchungen ausgesucht, da entzündliche Darmerkrankungen im Rahmen der therapeutischen Anwendungen von Calciumphosphat-Nanopartikeln in dieser Arbeit im Fokus stehen.

Wie schon im vorherigen Abschnitt wurden Calciumphosphat-Nanopartikel wieder mit pDNA funktionalisiert, die für eGFP kodierte. Gefriergetrocknete Nanopartikel wurden zunächst in Wasser redispergiert und rektal appliziert. In Abhängigkeit von der Zeit wurden die Zellen des Darms mittels FACS und qPCR auf die Expression von eGFP untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Abbildung 24 - Abbildung 27** zusammengefasst. Hauptsächlich bestehen die Darmwand und die *lamina propria* aus verschiedenen Epithelzellen und aus Zellen des Immunsystems. Für die FACS-Auswertung wurden daher die Epithelzellen von den CD45+ Zellen getrennt. CD45 ist ein Membranprotein, das von fast allen hämatopoietischen Zellen wie zum Beispiel Lymphozyten gebildet wird.^{126, 127} Auf Epithelzellen kommt dieses Protein nicht vor, sodass anhand dessen unterschieden werden kann.

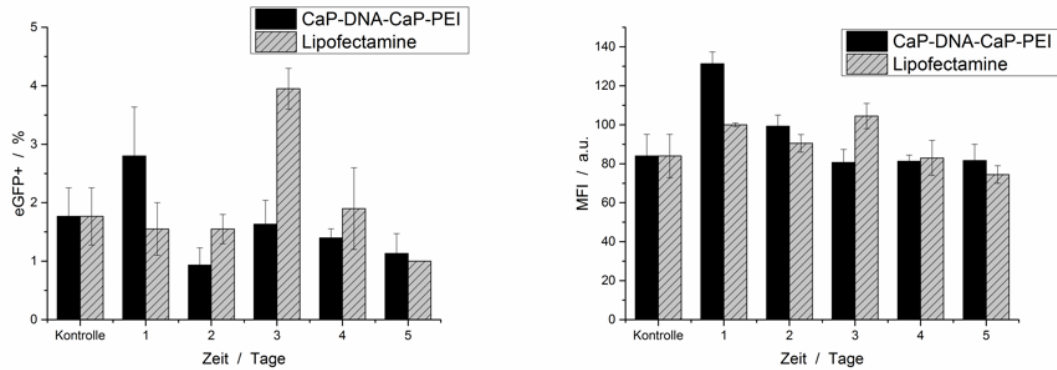


Abbildung 24: FACS-Auswertung von intestinalen Epithelzellen. (\pm Standardfehler)

Die Expression von eGFP in Mäusen, die mit Nanopartikeln bzw. Lipofectamine® behandelt wurden, wurde mit den Signalen von unbehandelten Mäusen verglichen (Kontrolle). Bereits am ersten Tag nach der Transfektion mit Nanopartikeln ließ sich ein stärkeres eGFP-Signal in den intestinalen Epithelzellen nachweisen. Sowohl der Anteil an eGFP-exprimierenden Zellen an der Gesamtzellpopulation (Prozentwert) als auch die mittlere Fluoreszenzintensität aller Zellen (MFI) stiegen an. Am zweiten Tag war der MFI nur noch leicht erhöht, während die Prozentzahl der eGFP-positiven Zellen nun als in der Kontrolle kleiner war. Ab dem dritten Tag nach der Transfektion war kein Unterschied zur Autofluoreszenz der Kontrolle mehr erkennbar, sodass spätestens hier kein Protein mehr in den Epithelzellen gebildet wurde. Im Falle der Transfektion mit Lipofectamine® war nach drei Tagen der Prozentsatz der eGFP-exprimierenden Zellen stark erhöht. Dies äußerte sich allerdings nur leicht im MFI. In beiden Fällen war die Expression von eGFP nur schwach nachweisbar und trat in einem kurzen Zeitraum auf.

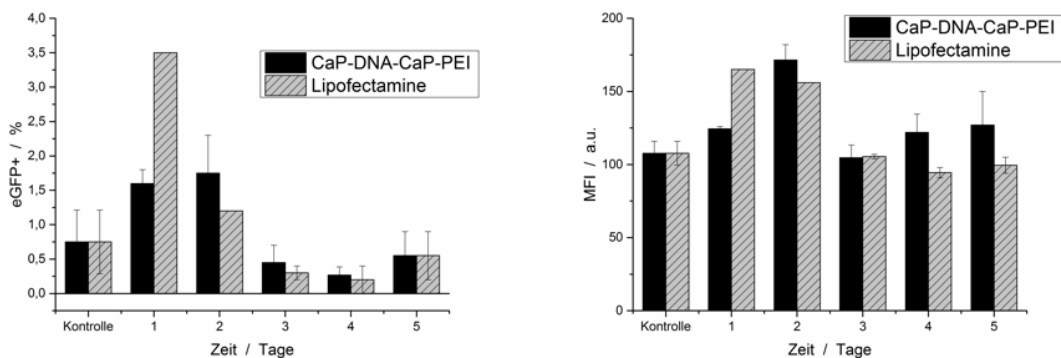


Abbildung 25: FACS-Auswertung von CD45+ Zellen aus dem Darm. (\pm Standardfehler)

Neben den Epithelzellen wurde die Expression von eGFP in CD45+ Zellen analysiert. Wie oben bereits beschrieben wurde, können diese Zellen anhand des Membranproteins CD45 von den anderen Zellen getrennt werden. CD45 wird unter anderem von T- und B-Zellen sowie von dendritischen Zellen exprimiert.^{127, 128} Vor allem dendritische Zellen können neben den Epithelzellen ans Darmlumen angrenzen.⁹¹ Im Falle der Nanopartikel war die eGFP-Expression wie schon bei den Epithelzellen an den ersten beiden Tagen nach der Transfektion leicht erhöht. Dies ließ sich wiederum sowohl am Anteil der eGFP-exprimierenden Zellen ablesen als auch an der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Während die Expression von eGFP zeitlich in Epithelzellen und CD45+ Zellen nach der Transfektion mit Nanopartikeln gleich war, setzte die Expression von eGFP nach der Transfektion mit Lipofectamine® in den CD45+ Zellen früher ein als in den Epithelzellen. So war die Expression auch im Falle von Lipofectamine® an den ersten beiden Tagen nach der Transfektion erhöht, während bei den Epithelzellen erst am dritten Tag ein Signal messbar war. Anders als bei den Epithelzellen hingegen ließ sich die Expression an eGFP in den CD45+ Zellen sowohl am Prozentanteil der eGFP-exprimierenden Zellen an der Gesamtzellpopulation als auch am MFI ablesen.

Neben Blutgefäßen ist der Darm von Lymphgefäßen durchzogen. Die Lymphgefäße führen im Darm zu den mesenterischen Lymphknoten.^{90, 92} Partikel können vor allem durch Transzytose in die Lymphgefäße oder durch Migration im Inneren von Lymphozyten dorthin gelangen.⁹²

Neben den Zellen in der Darmwand wurde daher auch die Expression von eGFP in den mesenterischen Lymphknoten untersucht.

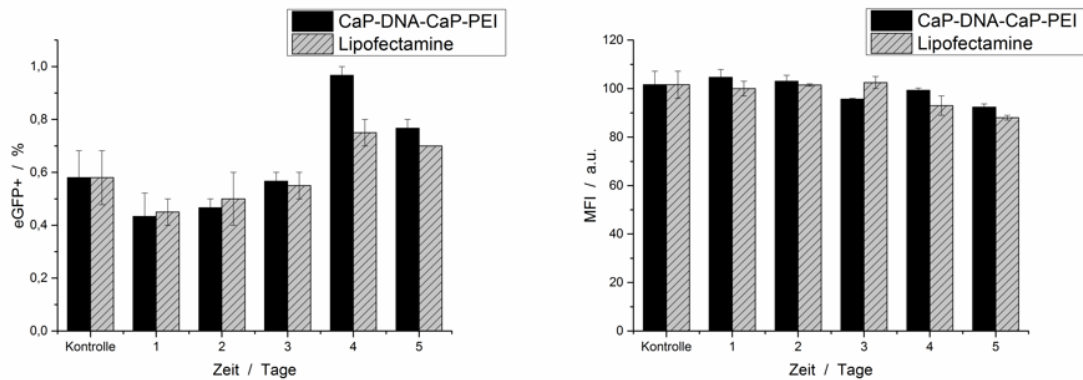


Abbildung 26: FACS-Auswertung der mesenterischen Lymphknoten (MLN). (\pm Standardfehler)

Ein sehr schwacher Anstieg der eGFP-Expression war in den Lymphknoten vier Tage nach der Transfektion am prozentualen Anteil der eGFP-exprimierenden Zellen zu erkennen. Der Anstieg war nach Transfektion mit Calciumphosphat-Nanopartikeln etwas stärker, jedoch ließ sich dieser Anstieg nicht im MFI der Zellen nachweisen.

Neben dem Nachweis des Fluoreszenzsignals von eGFP mittels FACS, sollte die Expression des Proteins auch auf mRNA-Ebene mittels qPCR nachgewiesen werden. Hierzu wurden sowohl der Darm als auch die mesenterischen Lymphknoten analysiert.

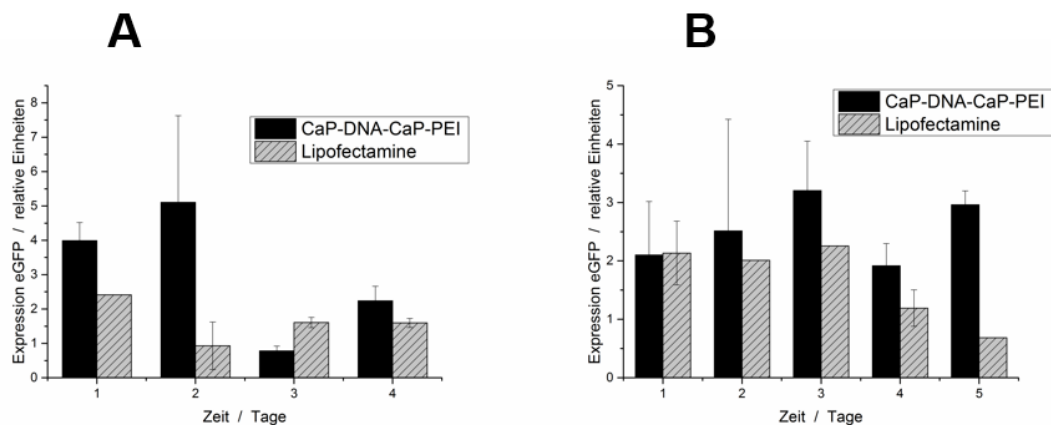


Abbildung 27: Expression an eGFP, bestimmt durch qPCR. Das Signal der Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte wurden darauf normiert. A – Expression im Kolon; B – Expression in den mesenterischen Lymphknoten. (\pm Standardfehler)

Bei der qPCR wurden die Signale der transfizierten Mäuse mit der unbehandelten Kontrolle normiert. Die Werte zeigen jeweils das Vielfache des Signals in der unbehandelten Kontrolle. Wie schon durch FACS-Messungen

nachgewiesen, steigt die Expression an eGFP in intestinalen Epithelzellen innerhalb der ersten zwei Tage nach der Transfektion an und fällt in den folgenden Tagen wieder auf das Niveau der Kontrolle ab. Weiterhin werden nach der Transfektion mit Nanopartikeln höhere Expressionslevel erreicht als durch Lipofectamine®.

Die Analyse der Expression der mesenterischen Lymphknoten zeigt im Falle der Nanopartikel die höchsten Expressionswerte am dritten und fünften Tag nach der Transfektion, während Lipofectamine® in den ersten drei Tagen die höchsten Expressionslevel liefert.

Bei den Zellkulturexperimenten wurde die Expression von eGFP nach 48 h untersucht. Jedoch konnte von *Chernousova et al.* gezeigt werden, dass die Expression von eGFP etwa 24 h nach der Transfektion von HeLa-Zellen mit Calciumphosphat-Nanopartikeln das Maximum bereits erreicht.¹²⁹ Desweiteren war die Expression viel höher als in den Darmzellen. Jedoch muss beachtet werden, dass die Prozesse im Darm sehr viel dynamischer sind. So werden Epithelzellen zwar ständig neu gebildet, jedoch sterben genauso viele ab. Die Lebensdauer der Epithelzellen beträgt dabei nur einige Tage.^{130, 131} Die Epithelzellen werden in den unteren Bereichen der Krypten gebildet. Als Krypten werden Vertiefungen der Darmwand bezeichnet. Im unteren Teil dieser Krypten sitzen Stammzellen, aus denen Epithelzellen hervorgehen. Die Epithelzellen wandern dann die Krypten entlang, bis sie an deren Ende „abfallen“. Nun ist es möglich, dass die Partikel nicht sehr weit in die Krypten hervordringen können und so nur Epithelzellen transfizieren können, die schon recht „alt“ sind. Diese würden dann zwei Tage nach der Transfektion absterben und das Signal müsste verloren gehen. Weiterhin teilen sich Epithelzellen nicht mehr, was das Eindringen eines Plasmides in den Zellkern erschwert. Im Falle der CD45+ Zellen sollte das eGFP-Signal ebenfalls nur innerhalb der ersten Tage messbar sein. Diese Zellen sind weitaus beweglicher als die Epithelzellen und können nach der Transfektion migrieren.

Um in die Lymphknoten zu gelangen, müssen die Partikel hingegen zunächst durch die Darmwand dringen und dann in die Lymphknoten gelangen. Für die Transfektion von Zellen in den Lymphknoten müssen die Partikel demnach einen weiteren Weg zurücklegen. Daher tritt das eGFP Signal, wenn überhaupt, hier erst verspätet auf.

Einen weiteren Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat die Inkubationszeit. Diese sollte im Zellkulturexperiment mindestens 3 h betragen. *In vivo* ist die Inkubationszeit jedoch nur sehr schwer zu kontrollieren. So kommt ein großer Teil der rektal applizierten Nanopartikeldispersion schon schnell nach der Applikation wieder heraus. Desweiteren ist das Verhältnis von Nanopartikeln zu Zellen im Darm wesentlich schlechter definiert und höchstwahrscheinlich auch wesentlich geringer.

Allgemein ist die Expression an eGFP unabhängig von der Transfektionsmethode sehr gering. Jedoch sind die Ergebnisse im Falle der Expression von eGFP im Darm nach der Behandlung mit Calciumphosphat-Nanopartikeln sehr konsistent. Im Falle der Transfektion von eGFP mittels Lipofectamine® liefern verschiedene Methoden der Auswertung des Experimentes verschiedene Ergebnisse. Auch die Expression in den mesenterischen Lymphknoten lässt sich nicht eindeutig nachweisen. Erschwert wird die Analyse desweiteren durch die hohen Hintergrundsignale, die schon in den unbehandelten Mäusen auftauchen. Generell lässt sich zusammenfassen, dass eine Transfektion von Zellen im Darm möglich war. Hierbei waren die Calciumphosphat-Nanopartikel etwas effizienter als Lipofectamine®. Der therapeutische Nutzen wäre jedoch sicherlich begrenzt, da der Darm nur mit geringen Effizienzen transfiziert werden konnte.

Alle *in vivo* Versuche zur Transfektion wurden von M.Sc. Annika Frede durchgeführt.

3.1.6 Zusammenfassung

Zwei Sorten calciumphosphatbasierter Nanopartikel wurden zur Transfektion verschiedener Zelltypen mit eGFP eingesetzt. Die Effizienz der Transfektion wurde mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsagens Lipofectamine® 2000 verglichen.

Neun verschiedene Zelllinien und hMSC wurden parallel und mit der gleichen Charge an Nanopartikeln transfiziert. Hierdurch konnten Variationen zwischen den Nanopartikeln und zwischen verschiedenen Zellpassagen minimiert werden. Zunächst konnte durch Aufnahmestudien gezeigt werden, dass alle Zelltypen die Nanopartikel aufnahmen.

Die Ergebnisse der Transfektion verschiedener Zelltypen zeigten dann, dass nur einige Zelltypen gut transfizierbar waren, während andere Zelltypen überhaupt nicht transfiziert wurden. Durch Zellteilung können Plasmide gut in den Zellkern gelangen, sodass schnell proliferierende Zellen sich besser transfizieren ließen als langsam proliferierende. Makrophagen ließen sich gar nicht transfizieren, was in der unterschiedlichen intrazellulären Prozessierung der aufgenommenen DNA begründet sein könnte.

Die Vitalität der Zellen verhielt sich invers zur Transfektionseffizienz. Zellen, die mit hohen Transfektionseffizienzen transfiziert wurden, wiesen eine geringe Vitalität auf, während untransfizierte Zellen robuster im MTT-Test reagierten. Unabhängig vom Transfektionsagens wurde somit eine Korrelation gefunden, die auf einen gemeinsamen Parameter hindeutet.

Neben der Auswertung der Transfektion anhand mikroskopischer Bilder wurde die Expression von eGFP in HeLa- und Mode-K Zellen mittels FACS und qPCR untersucht. Die drei verschiedenen Techniken lieferten hierbei gut vergleichbare Ergebnisse, obwohl unterschiedliche Zellpassagen und Partikelchargen verwendet wurden. So konnte die Transfektion auf mehreren Ebenen der Proteinbiosynthese nachgewiesen und quantifiziert werden.

Lipofectamine® lieferte zumeist die besten Transfektionseffizienzen, jedoch waren die Partikel ähnlich gut. Zwischen den beiden Partikelsorten gab es nur geringe Unterschiede.

Im letzten Schritt wurden die mit DNA funktionalisierten Partikel zur *in vivo*-Transfektion im Mausmodell eingesetzt. Da die beiden calciumphosphat-basierten Partikel in der Zellkultur kaum Unterschiede zeigten, wurden *in vivo* nur CaP-DNA-CaP-PEI-Partikel untersucht. Hierzu wurde die Dispersion rektal in den Darm der Versuchstiere injiziert. Die Proteinexpression wurde in Abhängigkeit der Zeit in verschiedenen Zellen mittels FACS und qPCR untersucht. In den Zellen des Darmes ließ sich 1-2 Tage nach der Transfektion eine leichte Expression an eGFP feststellen. In den mesenterischen Lymphknoten hingegen waren die Ergebnisse weniger konsistent. Die Expression von eGFP war hier erst nach 3-5 Tagen nach der Transfektion feststellbar. Insgesamt wurde der Nachweis von eGFP im Darm von der hohen Autofluoreszenz der unbehandelten Mäuse erschwert. Die Transfektionseffizienz bezogen auf die Gesamtzellzahl im Darm war sehr gering, jedoch konnte Transfektion nachgewiesen werden.

3.2 Genstummschaltung mit funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln

In Abschnitt 3.1 konnte ein Einfluss des Zelltyps auf die Transfektionseffizienz festgestellt werden. Anders als bei der Genstummschaltung muss bei der Transfektion die Nukleinsäure jedoch in den Zellkern gelangen. Dieser Schritt ist für den Erfolg der Transfektion entscheidend und mitverantwortlich für die unterschiedlichen Effizienzen bei verschiedenen Zelllinien. Der Einfluss der Partikel auf die Transfektion liegt aber hauptsächlich in der Überwindung der Zellmembran und der schnellen Befreiung aus dem Lysosom. Somit sind die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1 nicht ohne weiteres auf die Genstummschaltung übertragbar.

In diesem Abschnitt sollte daher die Effizienz verschiedener Partikelsorten auf die Stummschaltung von spezifischen Proteinen untersucht werden. Dazu wurde zunächst eGFP in HeLa-eGFP-Zellen stummgeschaltet. Diese Zellen exprimieren konstitutiv eGFP, sodass sie im Fluoreszenzmikroskop detektierbar sind. Die Stummschaltung konnte somit über qPCR auf mRNA-Ebene und mittels FACS und Fluoreszenzmikroskopie auf Proteinebene analysiert werden.

Im Anschluss sollten diese Ergebnisse auf die Stummschaltung des entzündungsrelevanten Proteins TNF- α übertragen werden. Ein Ziel der Arbeit war es, die Produktion entzündungsrelevanter Proteine im Darm zu unterbinden. Dafür wurde TNF- α in Mode-K-Zellen stummgeschaltet, da diese Zelllinie aus dem Darmepithel von Mäusen stammt.¹³²

Die Voraussetzung zur Genstummschaltung besteht zunächst in der Aufnahme der Partikel durch die Zellen. Somit wurde die Aufnahme der verschiedenen Partikelsorten in Mode-K-Zellen zeitabhängig untersucht. Im nächsten Schritt wurde die Expression des entzündungsrelevanten Proteins stimuliert, sodass die Partikel zur Stummschaltung eingesetzt werden konnten. Die Effizienz der Stummschaltung wurde jeweils mit Lipofectamine® verglichen. Anschließend wurde eine Partikelsorte zur therapeutischen Anwendung im Darm von Mäusen ausgewählt. Die Mäuse wurden dazu mit DSS stimuliert, sodass sie ein Krankheitsbild simulierten.

3.2.1 Charakterisierung der Nanopartikel

Fünf verschiedene Sorten an Nanopartikeln sollten auf ihre Effizienz zur Stummschaltung von spezifischen Genen getestet werden. Die Nanopartikel basierten hierbei auf Calciumphosphat, unterschieden sich jedoch in ihrer Zusammensetzung, Ladung und Morphologie. Der Aufbau und die Zusammensetzung der Partikel ist schematisch in **Abbildung 28** dargestellt.

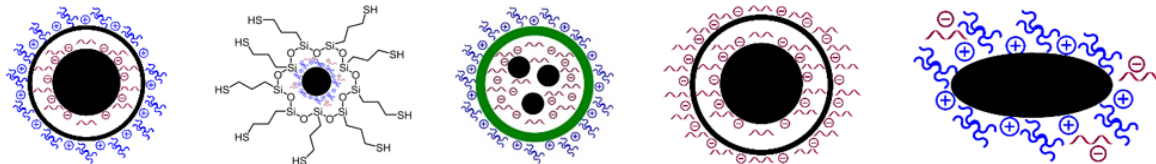


Abbildung 28: Schematische Darstellung der zur Genstummschaltung verwendeten Nanopartikelsorten. Schwarz – Calciumphosphat; rot – siRNA; blau – PEI; grün - PLGA

Die Darstellung der Partikel in **Abbildung 28** ist rein schematisch und soll nur den Aufbau der Partikel, wie er sich aus der Synthese ergibt, verdeutlichen. Die unterschiedliche Größe der Komponenten und Partikel untereinander ist hierbei nicht maßstabsgetreu wiedergegeben.

Alle Nanopartikelsorten wurden eingehend mittels REM, DLS, UV/Vis-Spektrometrie und AAS charakterisiert. So konnten die kolloidalen Eigenschaften, die Größe und Morphologie der Partikel, der Gehalt an Nukleinsäuren sowie die Anzahl der Partikel in der Dispersion bestimmt werden.

Abbildung 29 zeigt repräsentative REM-Bilder und DLS-Messkurven aller Partikelsorten. So wiesen alle Partikelsorten die jeweils typische Morphologie auf. Hauptsächlich lagen kugelförmige Partikel vor. Ostim® ist ein kommerziell erhältlicher, phasenreiner Hydroxylapatit in nanoskopischer Stäbchenform, der als 6 %ige Suspension in Wasser von aap erhältlich ist. In **Abbildung 29** ist die typische Stäbchenform im REM-Bild erkennbar.

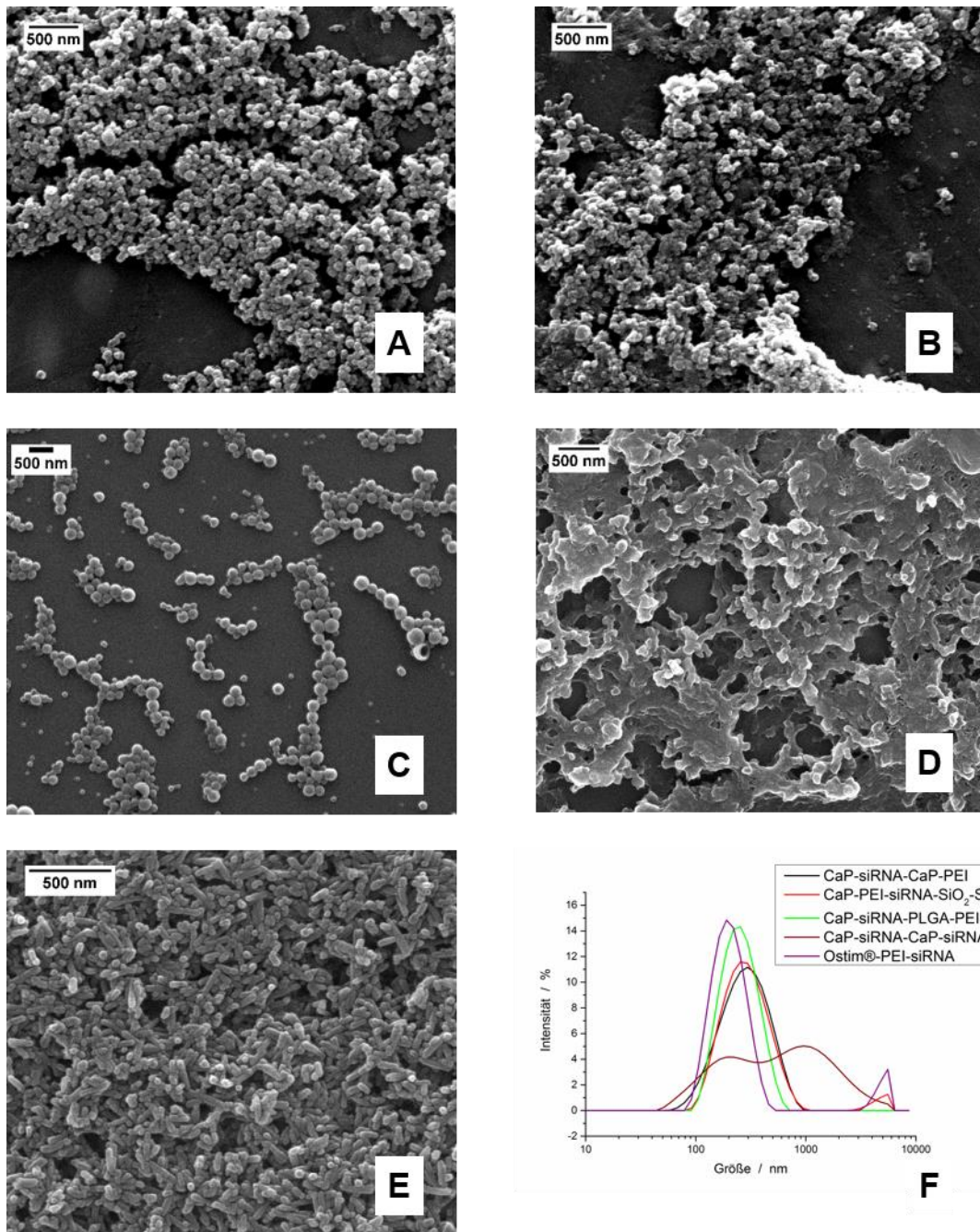


Abbildung 29: Charakterisierung der zur Genstummschaltung verwendeten Partikelsorten: A – CaP-siRNA-CaP-PEI; B – CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH; C – CaP-siRNA-PLGA-PEI; D – CaP-siRNA-CaP-siRNA; E – Ostim®-PEI-siRNA; und DLS-Messkurven der verschiedenen Partikelsorten (F).

Die Eigenschaften aller Partikelsorten sind in **Tabelle 3** zusammengefasst. Die Herstellung der Nanopartikel beruhte größtenteils auf im Lehrstuhl etablierten Synthesen. Die Effizienz der Partikel zur Genstummschaltung wurde jedoch nie direkt miteinander verglichen.

Tabelle 3: Charakterisierung der mit siRNA funktionalisierten Calciumphosphat Nanopartikel (\pm Standardabweichung)

	CaP-siRNA- CaP-PEI	CaP-PEI-siRNA- SiO ₂ -SH	CaP-siRNA- PLGA-PEI	CaP-siRNA- CaP-siRNA	Ostim®- PEI-siRNA
Konz. siRNA / $\mu\text{g mL}^{-1}$	22 \pm 9	29 \pm 18	9 \pm 2 $\mu\text{g mg}^{-1}$	66,7	19,5
Größe (DLS) / nm	294 \pm 124	249 \pm 31	289 \pm 82	370 \pm 29	224 \pm 2
Größe REM / nm	40-140	50-170	80-345	65-190	50 * 200
PDI (DLS)	0,17-0,49	0,25-0,49	0,13-0,5	0,52-0,56	0,26-0,3
Zetapotenzial / mV	16 \pm 3	26 \pm 5	21 \pm 10	-24,25 \pm 1	33 \pm 2
Partikelanzahl / $\times \text{mL}^{-1}$	1,1 $\cdot 10^{11}$	4 $\cdot 10^{10}$	1,1 $\cdot 10^{11} \text{ mg}^{-1}$	1,7 $\cdot 10^{10}$	8,5 $\cdot 10^{10}$
siRNA-Moleküle pro Partikel	8881	31336	3719	nicht berechnet	nicht berechnet

Die Synthese von CaP-siRNA-CaP-PEI- und CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln wurde analog zu CaP-DNA-CaP-PEI-Partikeln und CaP-PEI-DNA-SiO₂-SH-Partikeln durchgeführt. Die DNA wurde jedoch durch siRNA ersetzt. Die Werte der Calciumbestimmung waren unabhängig von der verwendeten Nukleinsäure etwa gleich und wurden daher zusammengefasst. Bei der Charakterisierung der Partikel mittels DLS wurden jedoch für die siRNA-funktionalisierten Partikel kleinere mittlere Radien gemessen als für DNA-funktionalisierten Partikel. Dies deutete auf eine geringere Tendenz zur Agglomeration hin. Auch in den DLS-Messkurven lagen etwas schmalere Größenverteilungen für die siRNA-funktionalisierten Partikelsorten vor. Die PDI-Werte der Messungen bewegten sich im gleichen Rahmen, wie die Werte der mit DNA funktionalisierten Partikel. Jedoch tendierten die Messergebnisse hierbei auch eher zu geringeren PDI-Werten. Die in der Tabelle gezeigten DLS-Daten sind Mittelwerte aus Messungen von Partikeln mehrerer Syntheseansätze.

Große Unterschiede ergaben sich jedoch bei der Konzentration an Nukleinsäuren in den kolloidalen Dispersionen. Bei den CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln war die Konzentration an Nukleinsäure nach Aufreinigung etwa doppelt so hoch wie bei CaP-DNA-CaP-PEI-Partikeln. Bei den CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln war die Konzentration an Nukleinsäuren nur etwa halb so groß wie bei CaP-PEI-DNA-SiO₂-SH-Partikeln. Die Konzentration an Nukleinsäure in der aufgereinigten

kolloidalen Dispersion korrelierte direkt mit der Anzahl an Nukleinsäuremolekülen pro Partikel. Es wurde davon ausgegangen, dass nicht adsorbierte Nukleinsäuremoleküle nach der Aufreinigung nicht mehr in der kolloidalen Dispersion verblieben.

Neben der unterschiedlichen Konzentration an Nukleinsäure in $\mu\text{g mL}^{-1}$ unterschieden sich siRNA und DNA erheblich in ihren Molmassen. Die Anzahl der Partikel pro mL war sowohl bei CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln als auch bei CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln etwa halb so groß wie bei den entsprechenden DNA-funktionalisierten Partikeln. Dies war auf unterschiedliche mittels REM-Bilder bestimmte Radien zurückzuführen.

Entsprechend der unterschiedlichen Mengen an adsorbierten Nukleinsäuren, dem Unterschied der molaren Massen der Nukleinsäuren und der unterschiedlichen Partikelanzahl war die Anzahl an Nukleinsäuremolekülen pro Partikel im Fall der siRNA bei beiden Partikelsorten in etwa 200-500 mal höher als bei den Plasmid-funktionalisierten Partikeln. Die Berechnung der Partikelanzahl und der Anzahl an siRNA pro Partikel wurde wie in Abschnitt 3.1 beschrieben durchgeführt. Die in **Tabelle 3** angegebenen Daten der siRNA-Moleküle pro Partikel beziehen sich auf Berechnungen mit anti-eGFP-siRNA ($M(\text{siRNA-eGFP})=14018,9 \text{ g mol}^{-1}$).

Die kolloidchemische Charakterisierung des CaP-siRNA-CaP-PEI-Systems und des CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Systems mittels DLS und REM ist ansonsten mit ähnlichen in der Literatur beschriebenen Systemen vergleichbar.^{33, 39, 57, 97}

Wie in Abschnitt 3.1 bereits für DNA beschrieben, war auch die siRNA in den CaP-siRNA-CaP-PEI und CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH Systemen jeweils durch äußere CaP- bzw. SiO₂-Schalen vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Bei dem CaP-siRNA-PLGA-PEI System war die siRNA von PLGA (Polylactid-co-glycolid) umgeben und dadurch ebenfalls vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Die CaP-Partikel dienten hierbei der Verbesserung der Verkapselungseffizienz von siRNA in die Polymerhülle. Nach dem Gefriertrocknen der Partikel konnten diese über eine an das *layer-by layer*-Verfahren angelehnte Beschichtungsmethode mit PEI funktionalisiert werden.¹³³

Diese Partikel ließen sich ohne Zusatz eines Kryoprotektors gefriertrocknen und anschließend leicht wieder redispergieren. Die CaP-siRNA-CaP-PEI- und CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel hingegen wurden in Anwesenheit von Trehalose als

Kryoprotektor lyophilisiert. Anschließend wurden diese Partikelsorten immer im gleichen Volumen redispergiert und lagen anschließend als kolloidale Dispersion vor. Die CaP-siRNA-PLGA-PEI Partikel wurden hingegen in einem gewünschten Volumen redispergiert. Somit beziehen sich die Angaben zur Konzentration an siRNA und Partikelanzahl in **Tabelle 3** jeweils auf 1 mg der Partikel. Analog zu Formel (2) wurde die Gesamtmasse an CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikeln durch die Masse eines Partikels dividiert, um die Partikelanzahl zu erhalten.

Die Charakterisierung dieser Partikel entspricht hierbei den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen.⁴⁶

Die CaP-siRNA-CaP-siRNA Partikel wurden nur mit siRNA funktionalisiert. Daher trugen sie eine negative Ladung. Der mehrschalige Aufbau dieser Partikel diente ebenfalls dem Schutz der Nukleinsäuren in der inneren Schale vor dem enzymatischen Abbau. Aufgrund ihrer nanoskopischen Größe wurden sie von Zellen aufgenommen und konnten zur Genstummschaltung verwendet werden. Dieses System wurde nicht aufgereinigt, sodass der Anteil an adsorbierten Nukleinsäuren nicht bekannt ist. Die Konzentration an siRNA hingegen ergab sich aus der Synthese. Zur Bestimmung der Partikelanzahl wurden die Partikel jedoch zentrifugiert, sodass die Menge an Calcium im Pellet mittels AAS bestimmt werden konnte. Das REM-Bild in **Abbildung 29D** zeigt kugelförmige Partikel. Jedoch scheinen die Partikel in einer Matrix eingebettet zu sein. Dies ist auf den Überschuss an Nukleinsäuren zurückzuführen. Beim Trocknen blieben diese neben den Partikeln auf dem REM-Träger zurück und bildeten einen Polymerfilm aus. DLS-Messungen der Partikel zeigten, dass diese teils agglomeriert vorlagen.

Ostim® sind kommerziell erhältliche stäbchenförmige Partikel in nm-Abmessungen. Die Stäbchen bestehen aus phasenreinem Hydroxylapatit. Das REM-Bild in **Abbildung 29E** bestätigte die stäbchenförmige Morphologie der Partikel. Die Verdünnung und Beschichtung der Nanopartikel mit PEI führte zu stark positiv geladenen Partikeln, die kolloidal stabil waren.¹³⁴⁻¹³⁶ Weiterhin konnte siRNA zu der kolloidalen Dispersion hinzugegeben werden. Dies war bis zu einer bestimmten Konzentration an siRNA möglich, ohne dass die Partikel eine negative Ladung erhielten oder die kolloidale Dispersion destabilisiert wurde. Anschließend konnten die Partikel als Transportvehikel für Nukleinsäuren im Genstummschaltungsexperiment eingesetzt werden. Im Gegensatz zu den

anderen Partikelsorten befand sich die siRNA hierbei außen auf den Partikeln. Sie könnte somit für RNasen zugänglich sein. Andererseits war die siRNA an der Oberfläche der Partikel adsorbiert, was schon als Schutz vor dem Abbau dienen könnte. Dieses System wurde nach Zugabe der siRNA ebenfalls nicht mehr gereinigt, sodass auch hier die Anzahl an siRNA pro Partikel nicht berechnet wurde. Die Konzentration an siRNA in der kolloidalen Dispersion war $19,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ und damit etwa halb so groß als die von *Klesing et al.* gefundene maximale Konzentration an siRNA vor Umladung der Partikel.¹³⁴ Der einzige Unterschied bei der Herstellung lag in den Zentrifugationsparametern, sodass unter Umständen nicht 100 % der Partikel im Zentrifugat waren. Dies ergibt sich aus den Daten der Elementaranalyse. So wurden die Partikel nach Stabilisierung mit PEI und Beladung mit siRNA erneut zentrifugiert. Der Calciumgehalt des Zentrifugats wurde nach Verwerfen des Überstandes mittels AAS bestimmt. Der Gehalt an HAP betrug hierbei nur 1/3 des theoretischen HAP-Gehaltes.

Alle Partikelsorten wurden schon zum Stummschalten von eGFP in HeLa-eGFP-Zellen eingesetzt. Jedoch wurden hier zum ersten Mal alle Partikel parallel in einem Experiment eingesetzt. Dies gewährleistete die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da Variationen der Zellen (Passage, Zellzyklus, usw.) ausgeschlossen wurden.

Der Einfluss einzelner Faktoren wie Partikelladung oder Morphologie auf die Genstummschaltung konnte in diesen Experimenten jedoch nicht bestimmt werden. So unterschieden sich die Partikel meist in mehreren Parametern, wodurch der Einfluss einzelner Eigenschaften unbekannt blieb. In diesen Versuchen wurde beispielsweise pro *well* immer die gleiche Menge an siRNA appliziert. Dies bedeutet aber gleichzeitig aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an siRNA-Molekülen pro Partikel, dass jeweils unterschiedlich viele Partikel pro *well* verwendet wurden.

3.2.2 Stummschaltung von eGFP in HeLa-eGFP-Zellen

Zunächst sollte die Effizienz der verschiedenen Partikel zur Stummschaltung von spezifischen Genen an HeLa-eGFP-Zellen getestet werden. Diese Zellen exprimierten konstitutiv das grün fluoreszierende Protein eGFP, sodass sie mittels eines Fluoreszenzmikroskops visualisiert werden konnten. Durch den Vergleich von licht- und fluoreszenzmikroskopischen Bildern konnte der Anteil an

fluoreszierenden Zellen ermittelt werden. Wird die zelluläre Synthese von eGFP mittels siRNA unterbunden, so sollte der Anteil der fluoreszierenden Zellen abnehmen. Desweiteren ließ sich die grüne Fluoreszenz des eGFP mittels FACS erfassen und analysieren. Diese zwei Methoden eigneten sich im Fall von eGFP dazu, die Stummschaltung auf Proteinebene zu untersuchen. Jedoch erfassten diese Methoden den Proteingehalt von Zellen nur indirekt und waren auf das Fluoreszenzsignal angewiesen. Diese Techniken eignen sich also nur zur Analyse der Proteinmenge von Proteinen, die durch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden können. Die Genstummschaltung kann jedoch mittels qPCR auch auf der mRNA-Ebene untersucht werden. Diese Technik bietet einen universelleren Ansatz, da so viele unterschiedliche Proteine zugänglich sind. Alle drei Techniken ermöglichen es, die Expression des Proteins auf die Zellzahl zu normieren. So konnte die verringerte Expression des Proteins nicht auf eine geringere Anzahl an Zellen zurückgeführt werden. So werden sowohl bei FACS als auch auf mikroskopischen Bildern jeweils Zellen gezählt. Bei der qPCR wird die Menge der mRNA eines Zielgens auf die Expression eines sogenannten *housekeeping*-Gens (in diesem Fall RPS9) normiert. Das *housekeeping*-Gen sollte von allen Zellen unabhängig von der Behandlung konstant exprimiert werden und korreliert somit mit der Zellzahl.

Zunächst wurden 2,24 µg siRNA pro *well* zu den Zellen gegeben. Die mikroskopischen Bilder nach der Inkubation mit den verschiedenen Nanopartikelsorten sind in **Abbildung 30** dargestellt. Die Stummschaltung durch die Nanopartikel wurde jeweils mit einer unbehandelten Kontrolle und mit der Stummschaltungseffizienz von Lipofectamine® 2000 verglichen.

Die **Abbildung 30** verdeutlicht, dass fast alle Nanopartikelsorten die Expression an eGFP reduzierten. Nur die CaP-siRNA-CaP-siRNA Partikel zeigten bei dieser Menge an siRNA keinen Effekt. Gleichzeitig wurde aber auch deutlich, dass viele Zellen im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle zwar schwächer leuchteten, jedoch im Fluoreszenzbild dennoch sichtbar waren. Dies veranschaulicht die Probleme bei der Auswertung der mikroskopischen Bilder, da Zellen, die weniger eGFP produzierten, genauso gewertet wurden wie Zellen, die viel eGFP produzierten. Bei der Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurde darauf geachtet, die Belichtungszeit von jeder Aufnahme konstant zu halten, um die Vergleichbarkeit der Bilder zu verbessern.

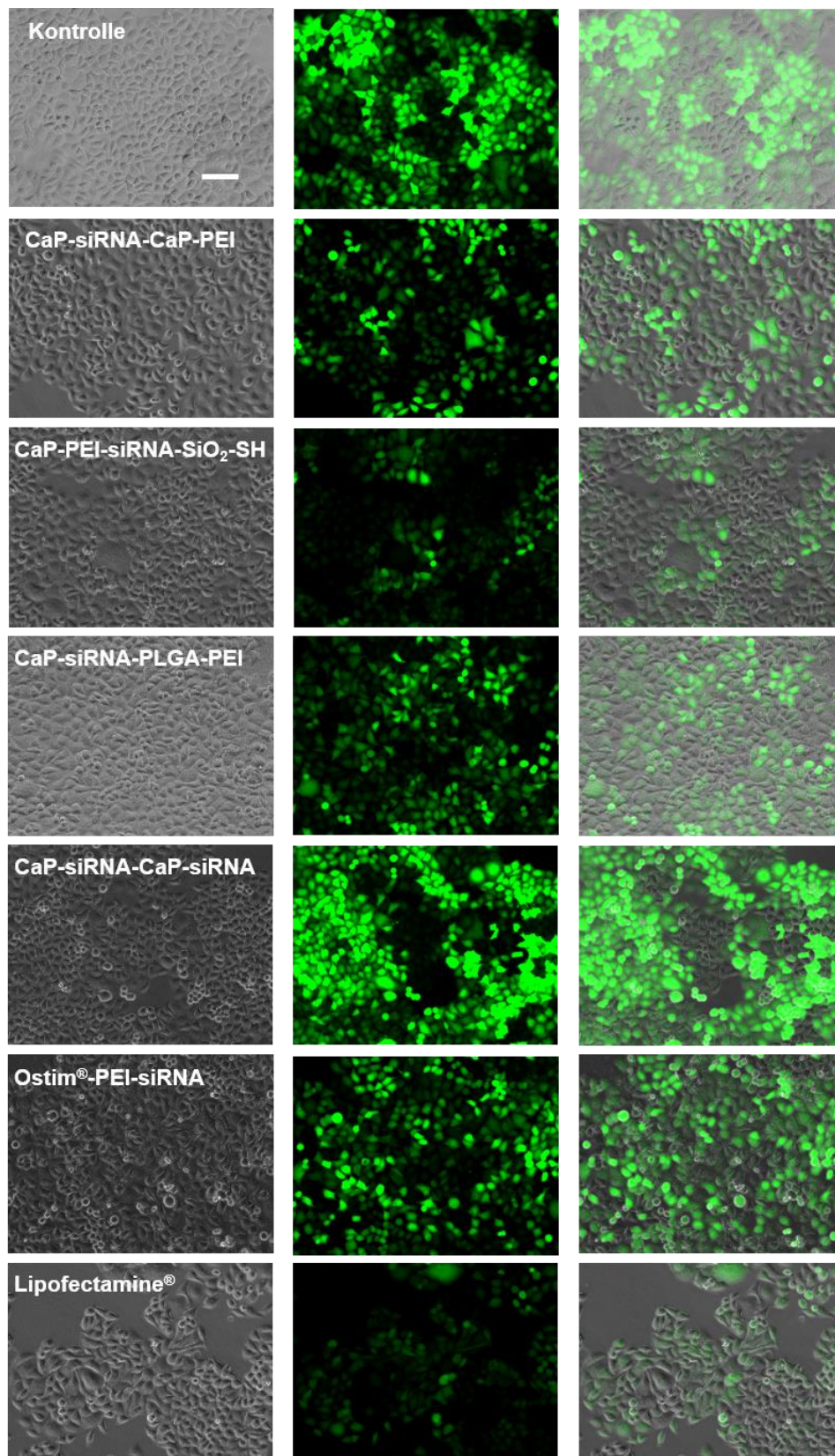


Abbildung 30: Mikroskopische Aufnahmen von HeLa-eGFP-Zellen nach der Stummschaltung von eGFP mit verschiedenen Nanopartikelsorten. Es wurden jeweils 2,24 µg siRNA pro *well* verwendet. Links: Lichtbild, Mitte: Fluoreszenzbild, Rechts: Überlagerung von Licht- und Fluoreszenzbild. Die Skala entspricht 100 µm, Vergrößerung: 20x.

Die quantitative Auswertung der mikroskopischen Bilder ist in **Abbildung 31** zusammengefasst. Neben den mikroskopischen Bildern wurde die Genexpression zusätzlich mittels FACS und qPCR untersucht. Die FACS-Auswertung erfolgte hierbei ausschließlich über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aller lebendigen HeLa-Zellen. Eine Kategorisierung zwischen eGFP-produzierenden Zellen und nicht-eGFP-produzierenden Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und den mit Nanopartikeln behandelten Zellen. Da schon die Zellen in der unbehandelten Kontrolle unterschiedlich starke Fluoreszenzintensitäten zeigten, war es nicht möglich die Grenzen zwischen eGFP+ und eGFP- zu definieren. Der MFI hingegen wies die unterschiedliche Produktion an eGFP durch die Zellen nach.

Die Expression an eGFP ist in **Abbildung 31** in Prozent aufgetragen und wurde jeweils auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Der MFI wurde dabei nur von lebendigen HeLa-Zellen berücksichtigt. Anhand des Streulichtes der Zellen wurde HeLa-Zellen identifiziert. Die Fluoreszenz des Farbstoffes 7-AAD (7-Aminoactinomycin) unterschied lebendige von toten HeLa-Zellen.

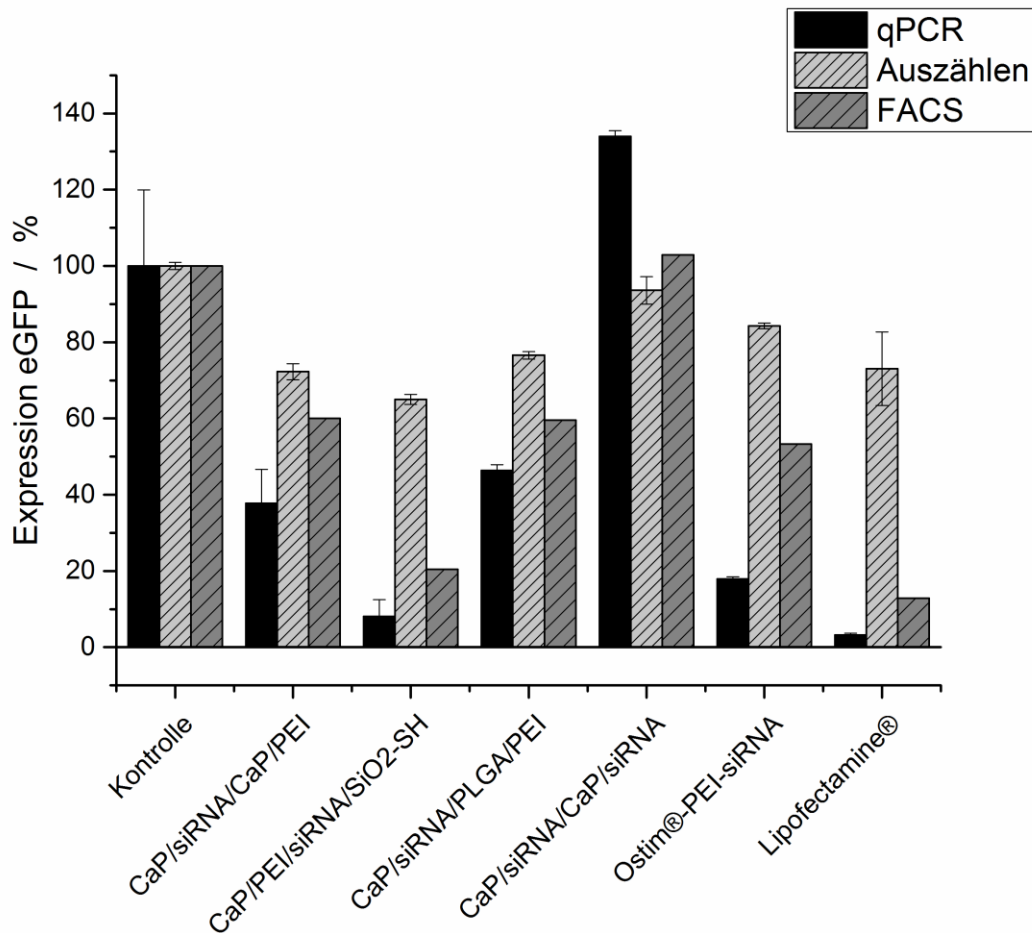


Abbildung 31: Expression von eGFP in HeLa-eGFP Zellen nach Stummschaltung von eGFP mittels funktionalisierter Nanopartikel und Lipofectamine®. Die Expression von eGFP in der Kontrolle wurde jeweils als 100% definiert. Die Expression an eGFP nach der Stummschaltung wurde auf die Kontrolle normiert, um die prozentuale Expression anzugeben. Pro *well* wurden 2,24 µg siRNA mit den unterschiedlichen Transportvehikeln appliziert. Mit Lipofectamine wurden nur 0,28 µg pro *well* appliziert. (± Standardfehler)

Die quantitative Auswertung bestätigte die in **Abbildung 30** qualitativ dargestellten Ergebnisse. So ließ sich eGFP in HeLa-eGFP-Zellen durch das Einschleusen der siRNA in Zellen mit hoher Effizienz stummschalten. Alle positiv geladenen Trägersysteme zeigten einen Effekt, der durch Lipofectamine®-vermittelte Stummschaltung am größten war. Ein vergleichbarer Effekt wurde mit CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln erreicht. Das negativ geladene Trägersystem lieferte keine messbare Stummschaltung von eGFP. Tendenziell waren die Ergebnisse der eGFP-Produktion von FACS und qPCR ähnlich. So schaltete Lipofectamine® sowohl nach FACS als auch nach qPCR die Produktion von eGFP am effizientesten ab. CaP-siRNA-CaP-siRNA zeigten nach beiden Techniken den

geringsten Effekt. Die quantitative Auswertung der mikroskopischen Bilder hingegen zeigte eine andere Verteilung der Stummschaltungseffizienzen. So wiesen Ostim®-PEI-siRNA-Partikel und Lipofectamine® hier beispielsweise schlechtere Effizienzen als CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel auf. Außerdem waren die durch das Auszählen mikroskopischer Bilder erfassten Unterschiede der Stummschaltungseffizienzen zwischen allen Systemen nur sehr gering. Wie bereits erwähnt, war dies auf teilweise stummgeschaltete Zellen zurückzuführen. So zeigten die mit Lipofectamine® stummgeschalteten Zellen auf den fluoreszenzmikroskopischen teilweise eine wesentlich geringere Fluoreszenzintensität als die Zellen in der Kontrolle. Dennoch gingen diese Zellen nun als nicht stummgeschaltet in die Statistik ein, da sie noch sichtbar waren. Eine genaue Bewertung der Fluoreszenzintensität der Zellen war anhand der mikroskopischen Bilder jedoch nicht möglich. Während **Abbildung 30** die Stummschaltungseffekte qualitativ gut zeigt, ist die quantitative Auswertung der Genstummschaltung anhand mikroskopischer Bilder deutlich schwieriger als bei der Transfektion.

FACS und qPCR zeigten hingegen größere Unterschiede zwischen den verschiedenen Transportvehikeln. Beide Techniken zeigten hier beim Vergleich der Stummschaltungseffizienzen der unterschiedlichen Nanopartikelsorten und Lipofectamine® tendenziell die gleiche Reihenfolge. Die quantitative Auswertung für jede Partikelsorte lieferte jedoch unterschiedliche Werte an eGFP, je nachdem ob die Expression mit qPCR oder FACS-Analyse untersucht wurde. Nun untersucht qPCR die Expression des Proteins auf der mRNA-Ebene, während FACS die Expression auf Proteinebene bestimmt. Die Halbwertszeit von eGFP in der Zelle ist nicht bekannt. Somit ist auch nicht bekannt, wie lange es dauert, bis ein Effekt auf mRNA-Ebene die Proteinebene erreicht. Desweiteren wurde die eGFP Expression beim FACS über die grüne Fluoreszenz des Proteins nur indirekt gemessen. Ob der Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Proteinkonzentration linear ist, wurde hierbei nicht überprüft und ist auch nicht bekannt. Somit waren unterschiedliche Werte durch beide Techniken zu erwarten. Jedoch konnte die Herunterregulierung von eGFP sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene relativ quantifiziert werden, wodurch Unterschiede der verschiedenen Trägersysteme deutlich wurden.

Im nächsten Schritt wurde die durch Nanopartikel verabreichte Menge an siRNA pro *well* auf 7,6 µg erhöht, um den Stummschaltungseffekt der Partikel zu steigern. In diesem Experiment wurden mittels CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln nur 4 µg siRNA pro *well* verabreicht und mittels Ostim®-PEI-siRNA-Partikeln nur 3,3 µg, da die Konzentration an siRNA auf diesen beiden Partikelsorten zu gering war, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. In **Abbildung 32** sind die Ergebnisse zusammengefasst.

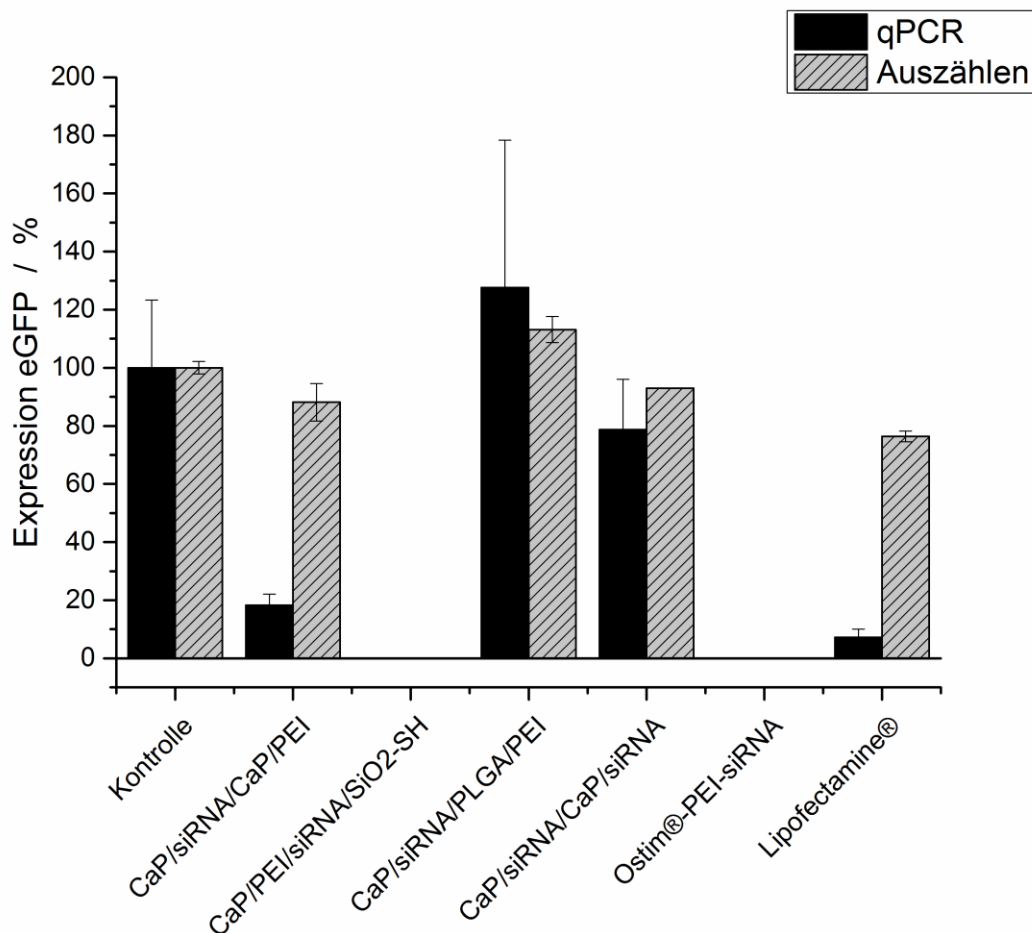


Abbildung 32: Expression von eGFP in HeLa-eGFP Zellen nach Stummschaltung von eGFP mittels funktionalisierter Nanopartikel und Lipofectamine®. Die Expression von eGFP in der Kontrolle wurde jeweils als 100 % definiert. Die Expression an eGFP nach der Stummschaltung wurde auf die Kontrolle normiert, um die prozentuale Expression anzugeben. Pro *well* wurden 7,6 µg siRNA mit den unterschiedlichen Transportvehikeln appliziert (CaP-siRNA-CaP-PEI 4 µg pro *well*; Ostim 3,3 µg pro *well*). Mit Lipofectamine® wurden nur 0,28 µg pro *well* appliziert. (± Standardfehler)

Die Erhöhung der Menge an siRNA führte bei den CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln und bei den CaP-siRNA-CaP-siRNA-Partikeln zu der erwarteten Erhöhung der

Stummschaltungseffizienz. Die negativ geladenen Partikel zeigten nun im Gegensatz zu vorher einen geringen Stummschaltungseffekt. Bei den positiv geladenen Partikeln hingegen wurde die eGFP-Expression nochmals stark verringert. Die Expression der mit CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln und Ostim®-PEI-siRNA-Partikeln behandelten Zellen wurde nicht analysiert, da die Toxizität nach Erhöhung der Dosis zu hoch war (**Abbildung 33**).

Die Erhöhung der Dosis der CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikel führte zum Verlust der Genstummschaltungseffekte. Im Gegensatz zu den anderen Partikelsorten erfordert die Freisetzung der siRNA bei dieser Partikelsorte jedoch den Abbau der PLGA-Hülle. In der Literatur liegen viele Hinweise vor, dass dieser Abbau intrazellulär neben der Hydrolyse der Esterbindungen auch enzymatisch katalysiert wird.¹³⁷⁻¹⁴⁰. Nehmen die Zellen aufgrund der erhöhten Dosis nun auch mehr Partikel auf, so ist es denkbar, dass die erhöhte Konzentration an PLGA und PEI den Abbau verlangsamt, sodass in der Zeitspanne des Zellkulturexperimentes keine Stummschaltung mehr nachweisbar war.

Während die mittels mikroskopischer Bilder erhaltenen Ergebnisse aus beiden Experimenten kaum einen Unterschied zeigten, sind die oben beschriebenen Unterschiede anhand der Resultate der qPCR-Messungen deutlich erkennbar.

Die verschiedenen Partikelsorten zeigten je nach Dosis einen veränderten Effekt. Jedoch wurden in diesen Experimenten jeweils nur zwei verschiedene Dosen getestet. Die optimale Dosis an siRNA konnte somit nicht für jede Partikelsorte ermittelt werden. Dies erschwert eine Aussage über das beste Partikelsystem.

Neben der Stummschaltungseffizienz wurde die Toxizität der verschiedenen Partikelsorten in Abhängigkeit der zwei verschiedenen Dosen untersucht. In **Abbildung 30** weisen die Zellen jeweils die für HeLa Zellen typische Morphologie auf. Dies deutete auf die Verträglichkeit von Partikeln und Zellen hin. Die Toxizität/Proliferation wurde wie schon zuvor für die Transfektion jeweils mit MTT-Tests quantifiziert. Die Ergebnisse der Toxizitätstests sind in **Abbildung 33** zusammengefasst.

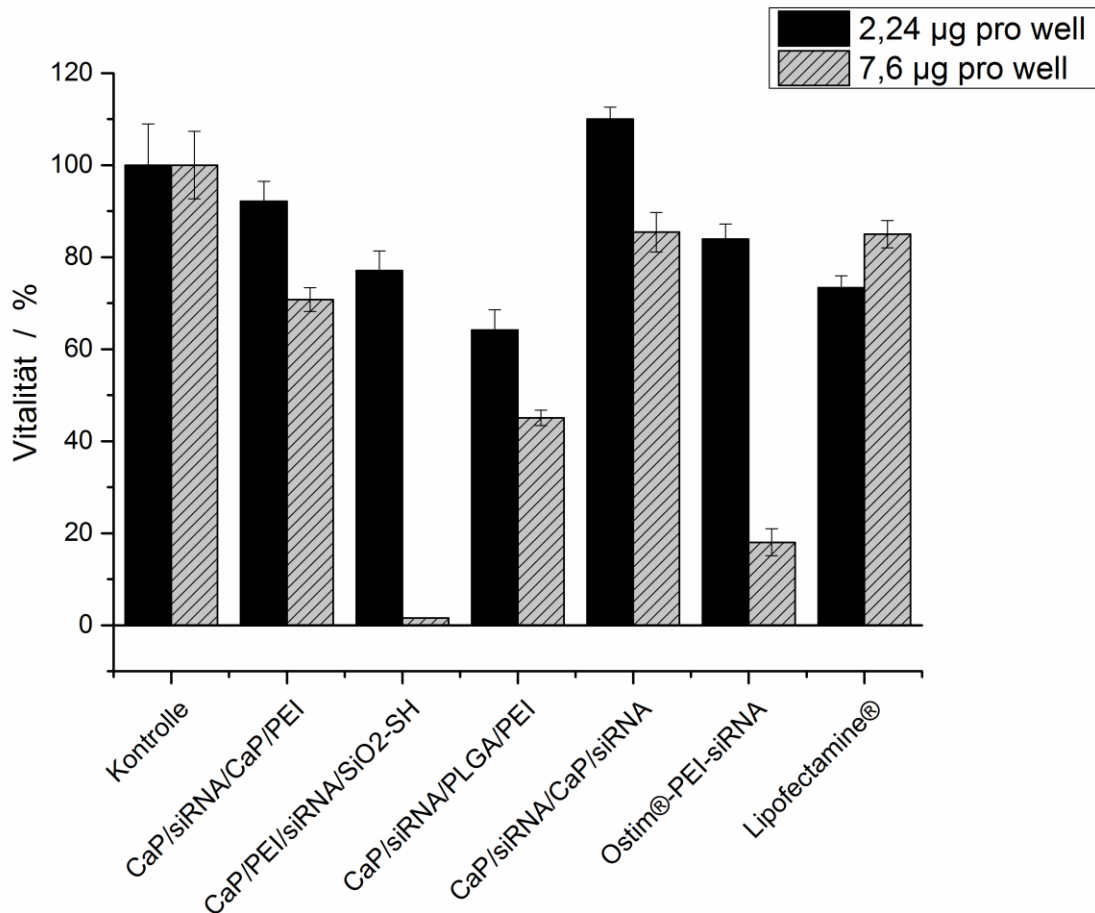


Abbildung 33: Vitalität der Zellen nach der Stummschaltung von eGFP mittels verschiedener Nanopartikelsorten. Die Vitalität wurde durch MTT-Tests bestimmt. Mit Lipofectamine® wurden nur 0,28 µg siRNA pro well appliziert (± Standardfehler)

Die Erhöhung der Dosis führte bei allen Partikelsorten zu einer Verstärkung der toxischen Nebeneffekte. Während die negativ geladenen Calciumphosphatpartikel kaum eine Stummschaltung bewirkten, so zeigten sie auch kaum toxische Nebeneffekte. Die CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel, CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel sowie Ostim®-PEI-siRNA-Partikel und Lipofectamine® zeigten bei ähnlich hoher Stummschaltungseffizienz auch vergleichbare toxische Nebenwirkungen. Die Vitalität der Zellen lag dann immer noch über 70 % im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen. Bei den drei verschiedenen Partikelsorten wurden die Effekte jedoch bei unterschiedlichen Konzentrationen an siRNA hervorgerufen. Während bei CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln und Ostim®-PEI-siRNA-Partikeln nur 2,24 µg siRNA pro well benötigt wurden,

mussten bei CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln 4 µg siRNA pro *well* appliziert werden, um ähnliche Effekte hervorzurufen.

Die CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikel zeigten bei der geringeren Dosis Stummschaltungseffekte, jedoch waren die toxischen Nebenwirkungen hierbei höher als bei den anderen Systemen.

Verschiedene Bestandteile der Partikel können toxische Nebenwirkungen hervorrufen. So kann eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Ca^{2+} zum Absterben der Zellen führen. Desweiteren ist bekannt, dass PEI und kationische Lipide toxische Nebenwirkungen hervorrufen. Diese Zusammenhänge wurden schon in Abschnitt 3.1 schon beschrieben.

Die FACS Messungen wurden von M.Sc. Annika Frede durchgeführt.

3.2.3 Aufnahme der Partikel in Mode-K-Zellen

Die Stummschaltung von eGFP in HeLa-eGFP-Zellen ließ sich sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene über verschiedene Techniken in hohen Effizienzen nachweisen.

Ein Ziel der Arbeit war es jedoch, die Expression entzündungsrelevanter Gene in intestinalen Epithelzellen zu regulieren. Die Aufnahme der funktionalisierten Nanopartikel in die Zielzellen ist eine Voraussetzung zur Stummschaltung. Daher wurde im Folgenden die Aufnahme aller Partikelsorten in Mode-K-Zellen untersucht. Die Aufnahme der Partikel ist in **Abbildung 34** durch licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gezeigt.

Um die verschiedenen Nanopartikelsorten im Mikroskop und FACS detektieren zu können, wurden sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dabei war der Farbstoff AlexaFluor®-647 kovalent an ein aus 21 Nukleotiden bestehendes Oligonukleotid (Oligo647) gebunden. Die Sequenz des Oligonukleotids war so gewählt, dass es keinen biologischen Effekt hervorrufen sollte.⁵⁷

Die Synthese der Partikel wurde analog zu den mit siRNA funktionalisierten Partikeln durchgeführt, jedoch wurde die siRNA durch das markierte Oligonukleotid (Oligo647) ersetzt. Somit wurde eine größtmögliche Vergleichbarkeit beider Partikelsorten gewährleistet. Morphologie, Größe und Ladung aller Partikelsorten wurden durch das Oligonukleotid nicht beeinflusst. Die Konzentration des Oligonukleotids war in den Partikeln mit Silikaschale mit $4,4 \pm 1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ jedoch niedriger als bei siRNA.

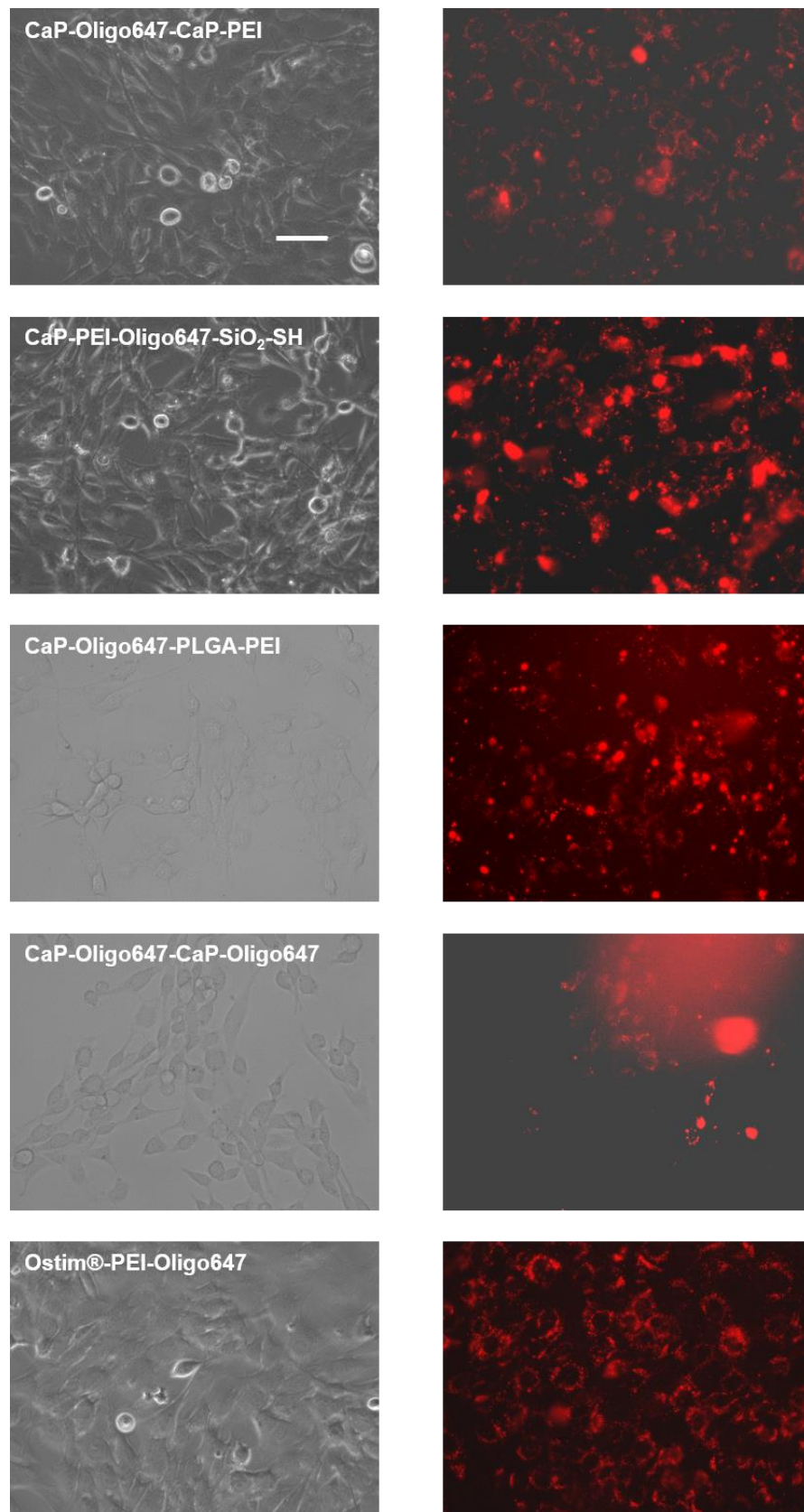


Abbildung 34: Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln nach 3 h Inkubation in Mode-K-Zellen. Die Partikel wurden mit Oligo647 funktionalisiert, sodass sie über ihre rote Fluoreszenz visualisiert werden konnten. Links: lichtmikroskopische Bilder von Mode-K-Zellen, rechts: fluoreszenzmikroskopische Bilder der Nanopartikel. Die Skala entspricht 50 μm , Zugabe von 1 μg Oligonukleotid pro *well*.

Die Menge an einzusetzenden Partikeln wurde bei den Aufnahmestudien auf die Menge an Oligonukleotid pro *well* normiert. Jeweils wurde 1 µg Oligonukleotid pro *well* zu den Zellen gegeben.

Abbildung 34 zeigt die deutliche Aufnahme aller Partikelsorten nach 3 h. Zu beachten ist, dass die Aufnahmen nicht mit einem konfokalen Laser-scanning-Mikroskop (CLSM) gemacht wurden. Die Lokalisation von Partikeln innerhalb der Zelle wurde somit nicht bewiesen. Alle Zellen wurden jedoch vor den mikroskopischen Aufnahmen ausgiebig mit PBS gewaschen, um die Partikel außerhalb der Zellen zu entfernen. Außerdem wurde deutlich, dass die Partikel mit der Zellwand interagierten, da die Morphologie der Zellen durch die Partikel abgebildet wurde. Bei den CaP-PEI-Oligo647-SiO₂-SH-Partikeln und den CaP-Oligo647-PLGA-PEI-Partikeln wurde die Interpretation der Bilder durch Agglomerate erschwert, die sich teilweise außerhalb der Zellen befanden und stark fluoreszierten. Dennoch bildeten Partikel auch hier die Form der Zellen ab. Die Aufnahme der Partikel wurde mittels FACS quantifiziert. Die Ergebnisse der Messungen sind in **Abbildung 35** zusammengefasst. Hierbei wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die Nanopartikel aufnahmen. Die Anzahl an Nanopartikeln, die aufgenommen wurde und die Anzahl an Nanopartikeln pro Zelle wurde nicht bestimmt. Außerdem konnte auch mit FACS-Messungen nicht unterschieden werden, ob die Partikel außen an der Zelle waren, oder innerhalb der Zelle. Auch vor den FACS-Messungen wurden die Zellen jedoch ausgiebig mit PBS gewaschen, um die Partikel, die nicht aufgenommen wurden, zu entfernen.

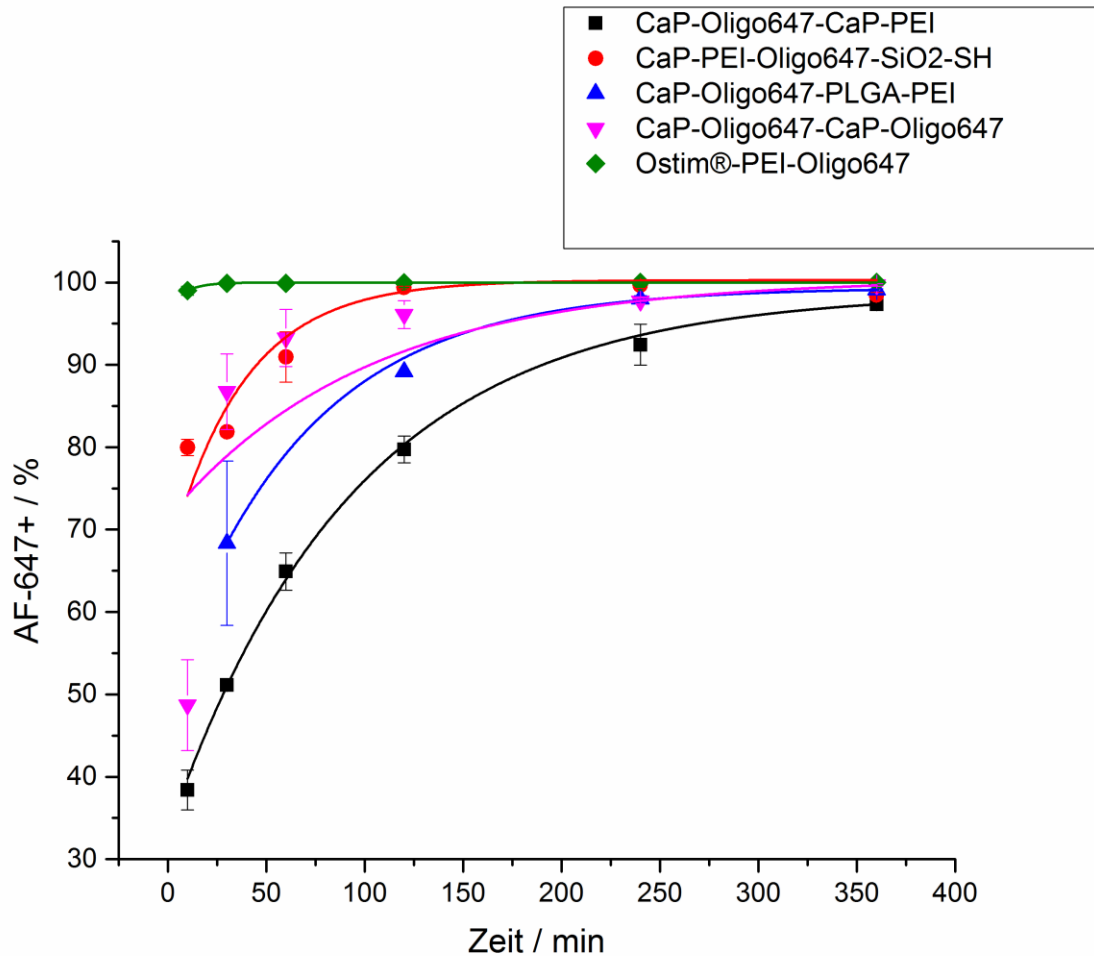


Abbildung 35: Quantifizierung der Partikelaufnahme durch FACS-Messungen.

Die in **Abbildung 35** dargestellten Kurven wurden durch einen exponentiellen Fit an die Daten angepasst. Unabhängig von der Partikelsorte nahmen nach 6 h fast 100 % der Zellen Partikel auf, sodass sie im FACS ein AF-647+ Signal zeigten. Der Prozentsatz bezieht sich hierbei auf die lebendigen Mode-K-Zellen. Das FACS bestätigte somit die Eindrücke der mikroskopischen Bilder. Einzig die Aufnahme der negativ geladenen CaP-Oligo647-CaP-Oligo647-Partikel schien im FACS besser zu sein, als mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Unterschiede äußerten sich in der Zeit, die die verschiedenen Partikelsorten benötigten, um mit den Zellen zu interagieren. So wiesen Zellen, die mit Ostim®-PEI-Oligo647 inkubiert wurden, schon nach 10 min zu über 90 % Partikelaufnahme auf. CaP-Oligo647-CaP-Oligo647-Partikel hingegen wurden erst nach 4 h Inkubationszeit von über 90 % der Zellen aufgenommen. Überraschend war dabei vor allem die schnelle Aufnahme der CaP-Oligo-647-

CaP-Oligo647 Partikel. Diese Partikel waren negativ geladen und sollten daher schlechter mit der negativ geladenen Zellmembran interagieren als die positiv geladenen Partikel. Dennoch hatten schon nach 30 min Inkubation 85 % der Zellen die Partikel aufgenommen. Im Fluoreszenzmikroskop hingegen war die Aufnahme dieser Partikel schwieriger nachzuweisen. Erst als die Belichtungszeit stark erhöht wurde, waren die Partikel zu detektieren.

Die FACS-Messungen wurden von M.Sc. Annika Frede durchgeführt.

3.2.4 Stummschaltung von TNF- α in Mode-K-Zellen

Mittels FACS und Fluoreszenzmikroskopie konnte die starke Aufnahme aller Partikelsorten durch Mode-K-Zellen nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurde nun das Potential der verschiedenen Partikelsorten zur Stummschaltung des entzündungsrelevanten Zytokins TNF- α (*tumor necrosis factor α*) in stimulierten Mode-K-Zellen untersucht.

TNF- α ist ein regulatorischer Schlüsselfaktor des Immunsystems und spielt daher eine Rolle bei Entzündungen, Infektionen und chronischen Immunerkrankungen.¹⁴¹⁻¹⁴³

TNF- α existiert sowohl in membrangebundener (tmTNF- α) als auch in gelöster (sTNF- α) Form. Dabei entsteht die gelöste Form durch enzymatische Spaltung aus der membrangebundenen Form. In der membrangebundenen Form kann TNF- α durch sogenanntes „reverse signalling“ Signale an die exprimierende Zelle weitergeben. Beide Formen können je an zwei TNF-Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) binden, wobei TNFR2 hauptsächlich von tmTNF- α aktiviert wird.^{141, 144}

Die beiden Rezeptoren können ihrerseits wiederum enzymatisch gespalten werden, sodass auch die Rezeptoren als lösliche Formen existieren, die TNF- α inhibieren können. Die Signalwege von TNF- α sind in **Abbildung 36** schematisch dargestellt.

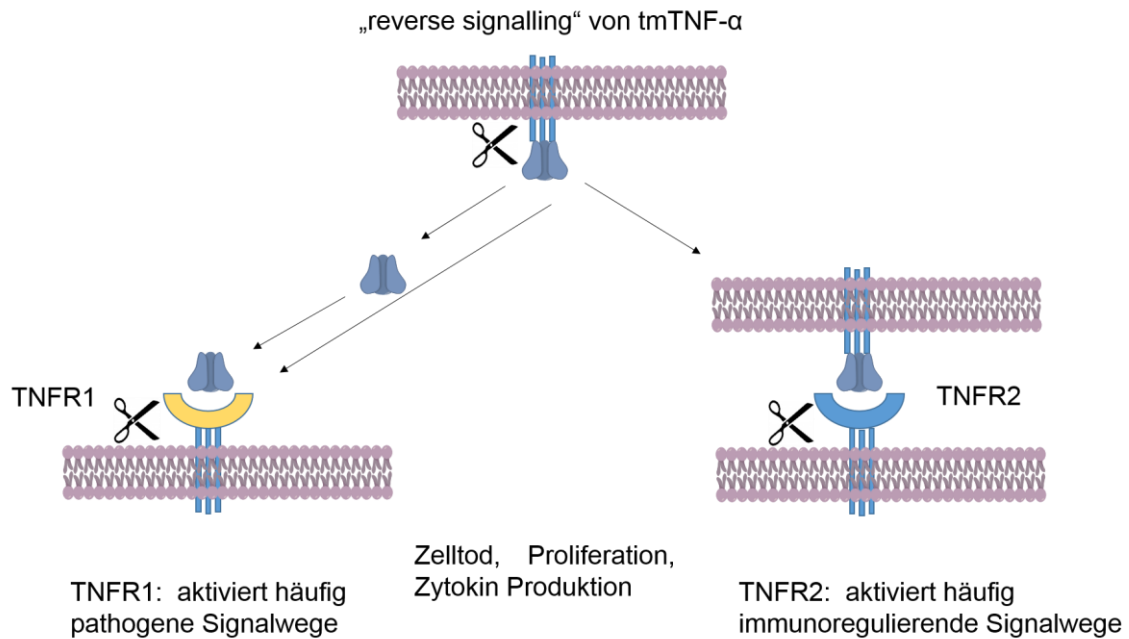


Abbildung 36: Schematische Darstellung der TNF-α-Signale. (Nach Vorlage aus Quelle¹⁴¹)

Die Komplexität der TNF-α-Signalwege verdeutlicht die Schwierigkeiten der therapeutischen Ansätze, TNF-α zu regulieren. So kann TNF-α sowohl Zelltod als auch Proliferation anregen. Dennoch konnte die Regulierung des Zytokins als Therapieansatz bei vielen Krankheiten erfolgreich angewendet werden. Therapieansätze gibt es unter anderem für Arthritis, Multiple Sklerose, Schuppenflechte, Paradontitis, sowie für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und *Colitis ulcerosa*.^{141-143, 145-153}

Während der akuten Phasen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel diseases*; IBD) ist die Expression von TNF-α hochreguliert. Die Produktion des Zytokins kann in intestinalen Epithelzellen, sowie in Zellen des Immunsystems, nach Erkennen von bakteriellen Signalen angeregt werden.¹⁴⁷

In der Zellkultur kann LPS (Lipopolysaccharide), welches auf der Oberfläche von gramnegativen Bakterien vorkommt,⁹² dazu verwendet werden, die Expression von TNF-α zu stimulieren. In dieser Studie wurden daher murine intestinale Epithelzellen (Mode-K) zunächst durch LPS stimuliert, TNF-α zu exprimieren. Die durch verschiedene Nanopartikel vermittelte Zugabe von siRNA sollte die Expression des Zytokins dann wieder herunterregulieren.

Die Ergebnisse der Stummschaltung von TNF- α sind in **Abbildung 37** zusammengefasst.

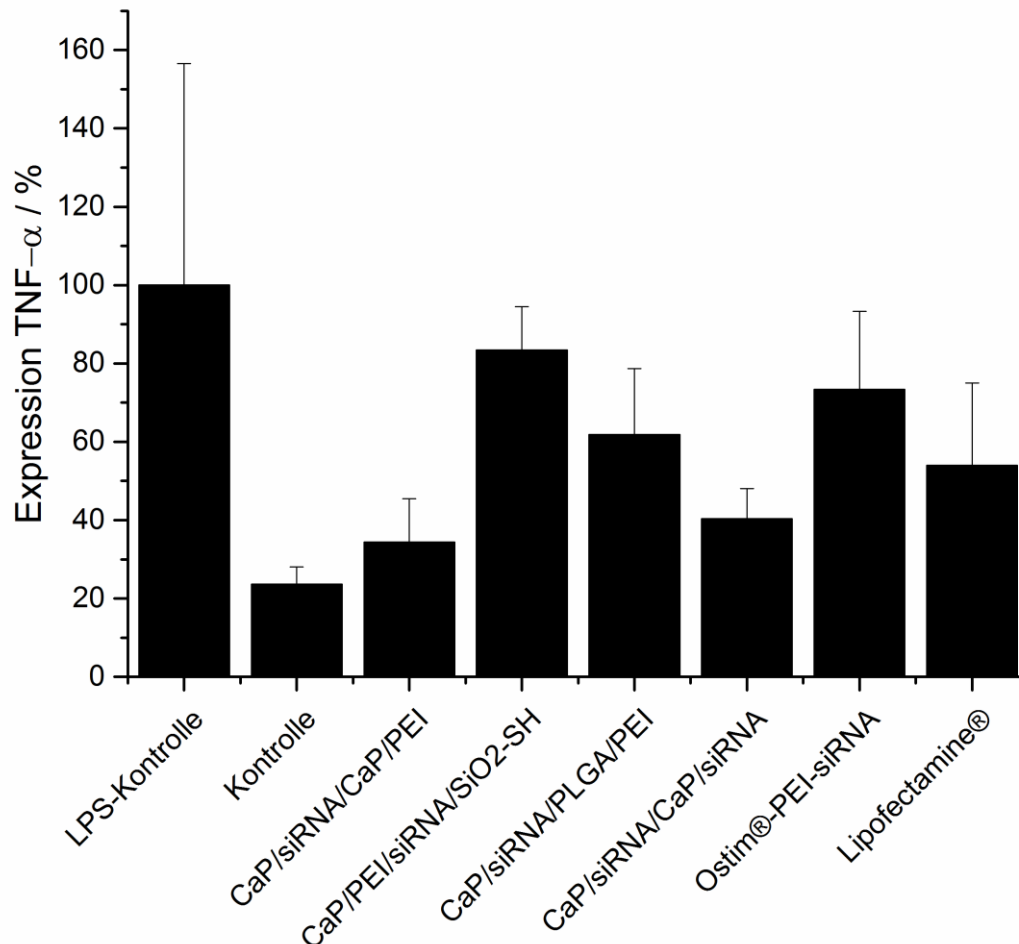


Abbildung 37: Stummschaltung von TNF- α in Mode-K Zellen. Pro *well* wurden 0,1 μ g siRNA zu den Zellen gegeben. Im Fall von Lipofectamine® wurden 0,28 μ g siRNA pro *well* verwendet. (\pm Standardfehler)

Die Menge an siRNA, mit der die Zellen inkubiert wurden, war konstant. Die Expression an TNF- α der nur mit LPS behandelten Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

Es wird deutlich, dass einige Partikelsorten in der Lage waren die Expression effektiv herunterzuregulieren. CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel und Ostim®-PEI-siRNA-Partikel zeigten kaum Effekte. Den stärksten Effekt zeigten CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel und CaP-siRNA-CaP-siRNA-Partikel. Die starken Effekte waren vergleichbar mit den durch Lipofectamine® erzielten Resultaten. Der

Fehlerbalken der LPS-Kontrolle in **Abbildung 37** war sehr hoch. Die Ergebnisse der CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel und CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikel waren jedoch sowohl für das eGFP System in HeLa-Zellen als auch für TNF- α in Mode-K-Zellen konsistent. Für diese beiden vielversprechenden Partikelsysteme konnten die Ergebnisse in weiteren Experimenten reproduziert werden. Die anderen Systeme wurden nicht weiter untersucht. Die Effizienz der Stummschaltung war dabei für das CaP-siRNA-CaP-PEI-System mit den Ergebnissen von Lipofectamine® vergleichbar.

In der Literatur wurde TNF- α in verschiedenen stimulierten Zelllinien und teilweise auch in *in vivo* Modellen stummgeschaltet. Die Genstummschaltungseffizienzen der jeweiligen Systeme wurde *in vitro* jeweils mit Lipofectamine® verglichen.^{145, 146, 154-157} Der Vergleich der Stummschaltungseffizienzen mit den Literaturdaten ist jedoch sehr schwierig, da unterschiedliche Zelltypen verwendet wurden. Wie auch im Falle der CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel waren die erreichten Stummschaltungseffizienzen zumeist mit Lipofectamine® vergleichbar. Die abschließende Frage welches Partikelsystem nun das Beste ist, konnte mit den Experimenten nicht abschließend geklärt werden. Einerseits wird der Vergleich dadurch erschwert, dass für jedes Partikelsystem die Anzahl an Partikeln mit der Konzentration an siRNA zusammenhängt. Somit muss eine Entscheidung getroffen werden, ob im Zellversuch auf die Anzahl an Partikeln oder die Menge an siRNA normiert wird. Beide Faktoren beeinflussen aber sicherlich die Genstummschaltungseffizienzen. Zusätzlich gibt es eine Reihe weiterer Variablen, die die Genstummschaltungseffizienzen beeinflussen. Daher konnten in diesem Vergleich nicht immer alle Partikelsysteme unter ihren optimalen Bedingungen eingesetzt werden.

Dennoch waren die CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel und CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikel unter den gegebenen Bedingungen dazu in der Lage, eGFP und TNF- α stummzuschalten. Diese Partikel wurden im Weiteren im *in vivo*-Mausmodell getestet. Ergänzend wurden außerdem die CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel getestet, da diese bei schon geringerer Dosis in der Lage waren eGFP in HeLa-Zellen effizient stummzuschalten.

Die Stummschaltungsversuche von TNF- α in Mode-K-Zellen wurden von M.Sc. Annika Frede durchgeführt.

3.2.5 Genstummschaltung *in vivo*

Der *in vitro*-Vergleich verschiedener Partikelsorten hat gezeigt, dass entzündungsrelevante Gene durch mit siRNA beladenen Nanopartikeln stummgeschaltet werden konnten. Tendenziell konnten mit den CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln die höchsten Effizienzen erreicht werden. Doch auch das CaP-siRNA-PLGA-PEI-System konnte in beiden Zellkulturmodellen erfolgreich angewendet werden. Die Verkapselungseffizienz der siRNA in die CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikel war jedoch wesentlich höher als bei den CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln. So wurde bei den CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikeln 40 % bis 60 % der eingesetzten siRNA verkapselt. Bei den CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln blieben hingegen nur 20 % bis 30 % der eingesetzten siRNA in der aufgereinigten Dispersion. Die siRNA stellt die teuerste Komponente der Partikel dar.

Da bei den *in vivo*-Versuchen einerseits viel siRNA benutzt werden musste, wurden in diesem System nur die CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikel ausgiebig untersucht. Andererseits erwiesen sich die CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel und die CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel in *in vivo*-Vorversuchen nicht als effizienter als die CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikel.

Wie bereits erwähnt wurde, wird beispielsweise TNF- α während der chronischen Phasen von entzündlichen Darmerkrankungen wie *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* stärker exprimiert. Als *in vivo*-Modell zur Untersuchung dieser Krankheiten ist die DSS-induzierte-*Colitis* (*dextran sodium sulfate*; DSS-*Colitis*) unter anderem in Mäusen in der Literatur etabliert.^{158, 159} Nun sollte die durch funktionalisierte Nanopartikel vermittelte Stummschaltung entzündungsrelevanter Gene in diesem Modell und deren therapeutischer Effekt untersucht werden.

In diesem Modell erhalten die Mäuse über das Trinkwasser DSS (*dextran sodium sulfate*, Natriumsalz von Dextransulfat). Der Grad der Krankheit (akut oder chronisch) kann über verschiedene Faktoren variieren. Unter anderem spielen das Molekulargewicht des DSS, aber auch genetische Faktoren eine Rolle. Das DSS führt dazu, dass die Darmwand durchlässiger wird. Moleküle und Mikroorganismen, die nun aus dem Lumen durch die Darmwand treten können, führen dann zur Entzündung des Darms. Während der Entzündung sind 173 Gene (darunter TNF- α) im Vergleich mit gesunden Mäusen unterschiedlich exprimiert.¹⁵⁸ Weiterhin lässt sich die Krankheit pathologisch charakterisieren. So

leiden kranke Mäuse unter anderem an Gewichtsverlust und blutigem Stuhlgang. Auf histologischer Ebene kommt es unter anderem zur Einwanderung von Neutrophilen in die *lamina propria* und *Submucosa*.

Zur Etablierung des Krankheitsmodells erhielten die Mäuse über einen Zeitraum von sechs Tagen 4 % DSS im Trinkwasser. Die Nanopartikel wurden an den Tagen 2-5 rektal als Dispersion verabreicht. Am sechsten Tag wurden die Versuchstiere geopfert und der Darm wurde mittels qPCR untersucht. Der zeitliche Ablauf des Experiments ist in **Abbildung 38** dargestellt.

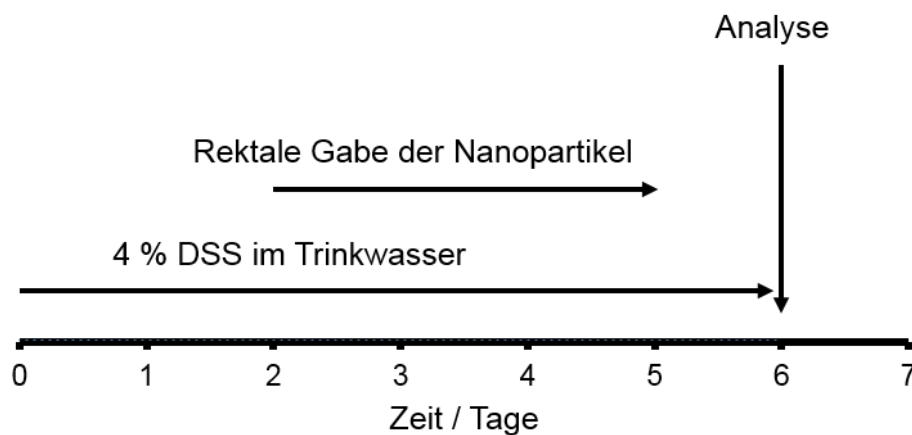


Abbildung 38: Zeitskala des *in vivo*-Stummschaltungsexperimentes. An den Tagen 0-6 wurde eine 4 %ige DSS-Lösung in Trinkwasser vergeben. An den Tagen 2-5 wurden jeweils rektal Nanopartikel verabreicht. Am 6. Tag wurden die Versuchstiere geopfert und analysiert.

Zur therapeutischen Anwendung der CaP-siRNA-PLGA-PEI-Nanopartikel wurden diese mit verschiedenen Sorten siRNA beladen, die jeweils die Expression von TNF- α , IP-10 (*interferon- γ induced protein 10*) und KC (*Keratinocide-derived cytokine*) verhindern sollte. Bei der Synthese wurde jeweils eine siRNA verwendet. Vor der rektalen Vergabe der Partikel wurden diese gemischt, sodass von jeder siRNA die gleiche Menge eingesetzt wurde.

Die Epithelzellen erfüllen im Darm eine wichtige Barrierefunktion. Die Barrierefunktion ist, wie bereits oben beschrieben wurde, bei der DSS-*Colitis* gestört. Daher wurden diese Zellen als Therapieansatz gewählt. Die Expression von TNF- α , IP-10 und KC sollte herunterreguliert werden, da einerseits bei der Etablierung des Krankheitsmodells gezeigt wurde, dass diese Proteine in den

Epithelzellen des Dickdarms während der akuten *Colitis* überexprimiert sind. Desweiteren scheinen IP-10 und KC von klinischer Relevanz bei der Behandlung chronischer Darmerkrankungen zu sein. Diese Chemokine sind vor allem in den Epithelzellen des Darmes hochreguliert. Sie können Einfluss auf die Barrierefunktion des Darmes nehmen, da ihre Sekretion zur Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen, NK-Zellen (*natural killer cells*) und neutrophilen Granulozyten führt.¹⁶⁰⁻¹⁶² Auch TNF- α ist als Schlüsselfaktor des Immunsystems bekannt und wurde in Abschnitt 3.2.4 schon beschrieben.

Abbildung 39 zeigt die relative Expression der entzündungsrelevanten Gene in der Darmwand nach Anwendung des Gemisches (siRNA MIX) der mit den verschiedenen siRNAs beladenen Nanopartikel. Die relative Expression der Gene wurde mittels qPCR ermittelt. Das Expressionslevel des entsprechenden Gens wurde jeweils mit der Expression eines *housekeeping*-Gens (in diesem Fall RPS9) normiert. Das Verhältnis beider Expressionslevel ergibt die relative Expression. Als Kontrolle wurden jeweils die Expressionslevel einer gesunden mit PBS (*phosphate buffered saline*) behandelten Maus gemessen.

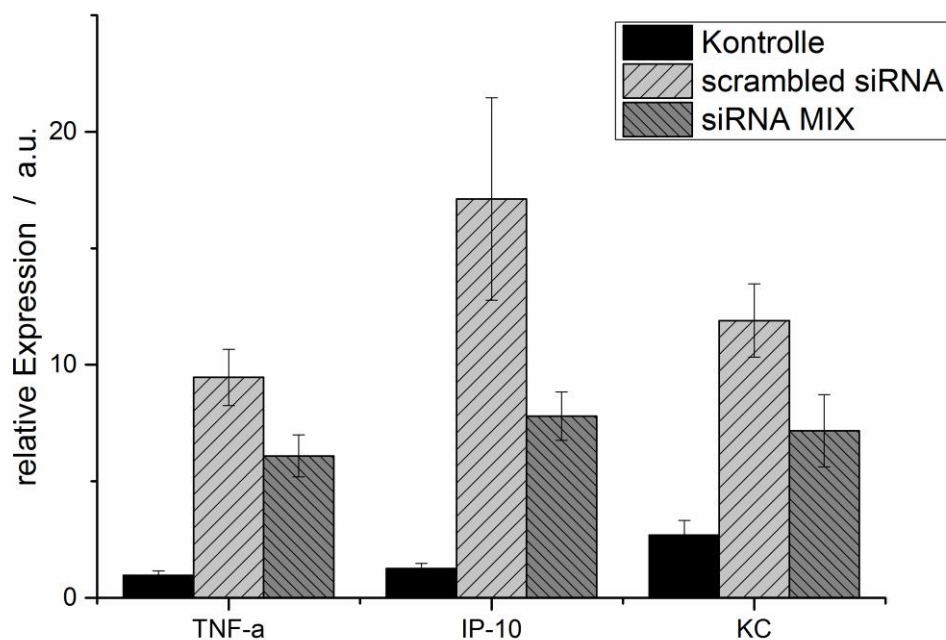


Abbildung 39: Stummschaltung der entzündungsrelevanten Gene TNF- α , IP-10 und KC im Kolon nach Behandlung mit CaP-siRNA-PLGA-PEI-Nanopartikeln. (\pm Standardfehler)

Die relative Expression der entzündungsrelevanten Gene in kranken Mäusen, die mit einem Gemisch aus 3 siRNAs behandelt wurden, wurde mit der Expression in gesunden Mäusen (Kontrolle) und der Expression in kranken Mäusen, die mit nicht-funktioneller siRNA (scramble) behandelt wurden, verglichen. So wurde deutlich, dass die Expression der Zielgene mittels funktioneller siRNA im Vergleich mit nicht funktioneller siRNA deutlich herunterreguliert wurde. Trotzdem wurden alle Gene stärker exprimiert als in gesunden Mäusen.

Neben der Expression der Gene in der Darmwand wurde auch die Expression von TNF- α und IP-10 in den mesenterischen Lymphknoten untersucht (**Abbildung 40**).

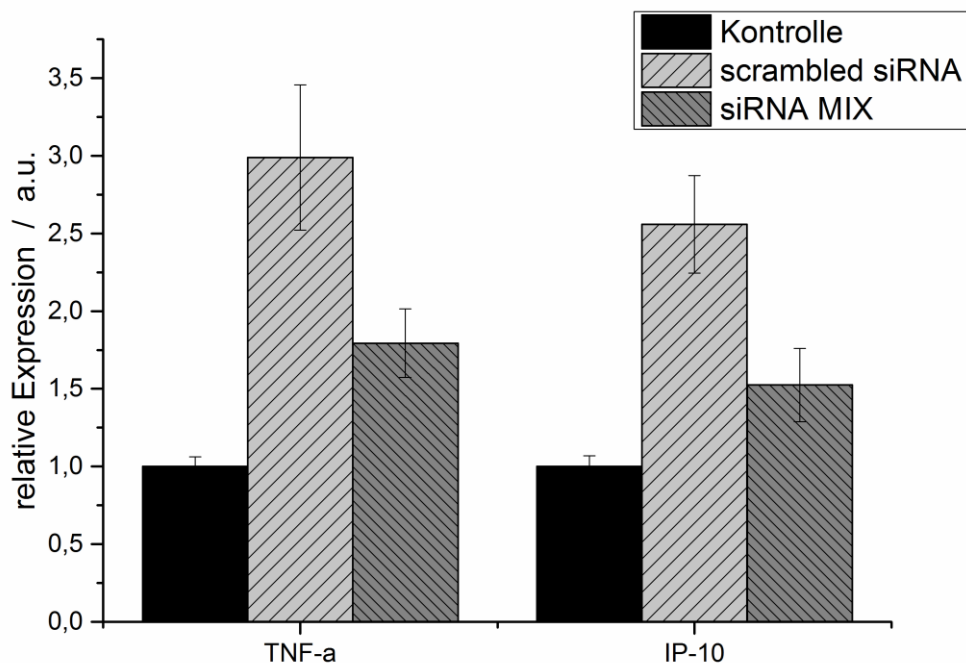


Abbildung 40: Stummschaltung der entzündungsrelevanten Gene TNF- α , IP-10 und KC in den mesenterischen Lymphknoten nach Behandlung mit CaP-siRNA-PLGA-PEI-Nanopartikeln. (\pm Standardfehler)

Diese beiden Gene wurden in den mit *scrambled*-siRNA behandelten Mäusen etwa dreimal so stark exprimiert wie in gesunden Mäusen. Nach Behandlung mit funktionellen siRNAs konnte die Expression wiederum um etwa 50 % gesenkt werden und betrug das 1,5 fache von gesunden Mäusen. Diese Gene waren in den entzündeten Geweben wesentlich stärker hochreguliert als in den mesenterischen Lymphknoten.

Die Daten der qPCR zeigen, dass durch die Applikation von funktionellen CaP-siRNA-PLGA-PEI-Nanopartikeln die Expression der gewünschten Gene verringert wurde. Um zu zeigen, dass die Regulierung dieser Gene auch einen therapeutischen Effekt hatte, wurde der *disease activity index* von mit unfunktionellen Nanopartikeln behandelten Mäusen mit dem *disease activity index* von mit funktionellen Nanopartikeln behandelten Mäusen verglichen.

Der *disease activity index* soll anhand der Symptome die Ausprägung der Krankheit charakterisieren. Dabei wurde die Krankheit auf einer Skala von 1 - 9 bewertet, wobei 9 der schwerste Krankheitsgrad war. Es wurden drei Parameter untersucht und auf einer Skala von 1 - 3 bewertet. Die Summe aller Grade ergab dann den *disease activity index*. Erfasst wurde der Verlust an Körpergewicht, die Konsistenz des Stuhlgangs sowie rektale Blutung.¹⁶³ **Abbildung 41** zeigt den *disease activity index* am 6. Tag von kranken Mäusen die entweder mit funktionellen (siRNA MIX) oder unfunktionellen Nanopartikeln (scramble) behandelt wurden.

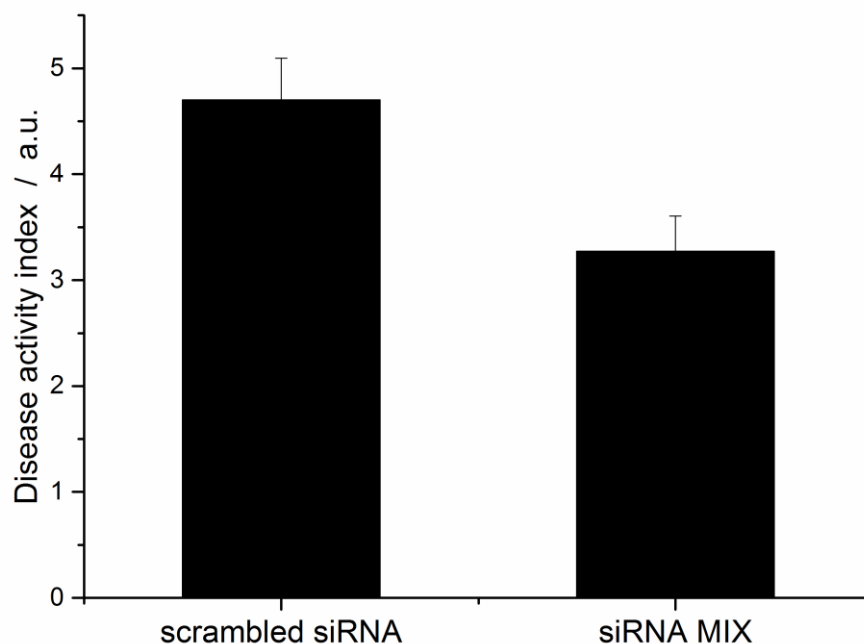


Abbildung 41: *Disease activity index* nach Behandlung kranker Mäuse mit Nanopartikeln, die entweder mit verschiedenen funktionellen siRNAs (MIX) oder nicht funktioneller siRNA (scramble) beladen waren. (\pm Standardfehler)

Abbildung 41 zeigt, dass die Stummschaltung der ausgewählten, entzündungsrelevanten Gene auch den Grad der Krankheit positiv beeinflussen konnte. So nahm der *disease activity index* von Mäusen ab, die mit funktionellen Nanopartikeln behandelt wurden.

Der Vergleich dieses Systems zur Stummschaltung von entzündungsrelevanten Genen im *in vivo*-Modell mit anderen in der Literatur bekannten Systemen gestaltet sich schwierig. So unterscheiden sich die experimentellen Voraussetzungen. Neben der Menge der siRNA, der Länge des Experiments, Häufigkeit der Applikation, Applikationsroute und der Etablierung der DSS-*Colitis* unterscheiden sich auch die Mausstämme und die untersuchten Zellpopulationen. Dennoch gelang die siRNA-vermittelte Stummschaltung *in vivo* durch verschiedene Transportvehikel. Zumeist wurde dabei TNF- α gezielt herunterreguliert.^{145, 146, 156, 157, 164-167}

Die *in vivo*-Experimente zur Stummschaltung von entzündungsrelevanten Genen wurden von M.Sc. Annika Frede durchgeführt. Diese und weitere Ergebnisse zu den therapeutischen Effekten der Partikel werden ausführlicher in ihrer Dissertationsschrift behandelt.

3.2.6 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden 5 verschiedene Sorten auf Calciumphosphat basierender Nanopartikel mit siRNA funktionalisiert und zur Genstummschaltung eingesetzt. Nach kolloid-chemischer Charakterisierung aller Partikelsorten, wurden die Partikel zunächst zur Stummschaltung von eGFP in HeLa-eGFP-Zellen eingesetzt. Mit drei verschiedenen Techniken (Fluoreszenzmikroskopie, FACS, qPCR) konnte die Effizienz der Stummschaltung sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Hierbei stellte sich heraus, dass Fluoreszenzmikroskopie eher für qualitative Ergebnisse sinnvoll war. Mit FACS und qPCR hingegen wurden quantitative Ergebnisse erhalten.

Im nächsten Schritt sollten die Ergebnisse auf die Stummschaltung des entzündungsrelevanten Zytokins TNF- α in Mode-K-Zellen übertragen werden. Dazu wurden zunächst alle Partikel mit fluoreszierenden Oligonukleotiden funktionalisiert. Durch die Funktionalisierung der Partikel konnte die Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS verfolgt werden. Es stellte sich

heraus, dass alle Nanopartikelsorten von der murinen Darmepithelzelllinie Mode-K aufgenommen wurden. Anschließend wurde TNF- α in mit LPS stimulierten Mode-K-Zellen herunterreguliert. Dabei konnten mit Lipofectamine® vergleichbare Effekte erzielt werden.

Im letzten Schritt konnte die Stummschaltung von ausgewählten entzündungsrelevanten Genen im *in vivo*-Mausmodell gezeigt werden. Dazu wurde über DSS im Trinkwasser ein entzündetes Darmmodell etabliert. Die rektale Applikation von mit verschiedenen siRNAs beladenen CaP-siRNA-PLGA-PEI-Nanopartikeln führte zu einer abgeschwächten Expression der gewünschten Gene im Krankheitsmodell. Die reduzierte Expression der entzündungsrelevanten Gene führte außerdem zu einer Abschwächung der Krankheitssymptome, sodass ein therapeutischer Effekt der funktionellen Nanopartikel nachgewiesen wurde.

3.3 Strategien zum Transport von Nanopartikeln in den Darm

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel sowohl zur Transfektion als auch zur Stummschaltung von entzündungsrelevanten Genen eingesetzt werden können. Neben den biologischen Effekten erfordert die therapeutische Anwendung der funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel außerdem den effektiven Transport zu den gewünschten Geweben. So wird bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel diseases*, IBD) unter anderem das entzündungsrelevante Zytokin TNF- α während der entzündlichen Phasen im Darm stärker exprimiert. Die therapeutische Beeinflussung der Expression des Zytokins sollte sich dabei lokal auf die gewünschten Orte beschränken. Dadurch ließen sich Nebenwirkungen verringern. Funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel könnten die Expression von TNF- α beeinflussen, müssen dafür aber intakt in den Darm transportiert werden.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰

Der Transport der Partikel in den Darm ist über zwei Routen möglich. Der für den Patienten angenehmere Weg ist sicherlich die perorale Aufnahme der Partikel. Bevor die Partikel im Darm wirksam werden können, müssen sie jedoch zunächst durch den Magen gelangen. Im sauren Milieu des Magens lösen sich Calciumphosphatpartikel jedoch auf und die Funktionalisierung wird zerstört. Um dies zu verhindern, wurden gefriergetrocknete, funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel in eine Gelatine kapsel gefüllt. Die Kapsel wurde anschließend mit dem pH-sensitiven Polymer Eudragit® L 100 beschichtet. Dieses Polymer ist bei sauren pH-Werten wasserunlöslich und schützt die Partikel daher vor der Magensäure. Bei pH-Werten >6 ist das Polymer wasserlöslich. Somit löst es sich im Darm auf, und nach dem Auflösen der Gelatine kapsel können die Partikel freigesetzt werden.

Alternativ können die Partikel über rektale Vergabe in den Darm gelangen. Hierfür wurde ein Zäpfchen entwickelt, das ebenfalls zuvor gefriergetrocknete, funktionalisierte Calciumphosphat Nanopartikel enthielt. Das Zäpfchen bestand dabei aus *adepts solidus* (Hartfett). Der Schmelzpunkt des Hartfetts liegt bei 34 °C. Im ersten Schritt konnten die Nanopartikel im geschmolzenen Fett dispergiert werden. In einer geeigneten Form wurde das Fett bei

Raumtemperatur wieder fest. Bei Körpertemperatur schmilzt das Fett wiederum, um so die Partikel im Darm freizusetzen.

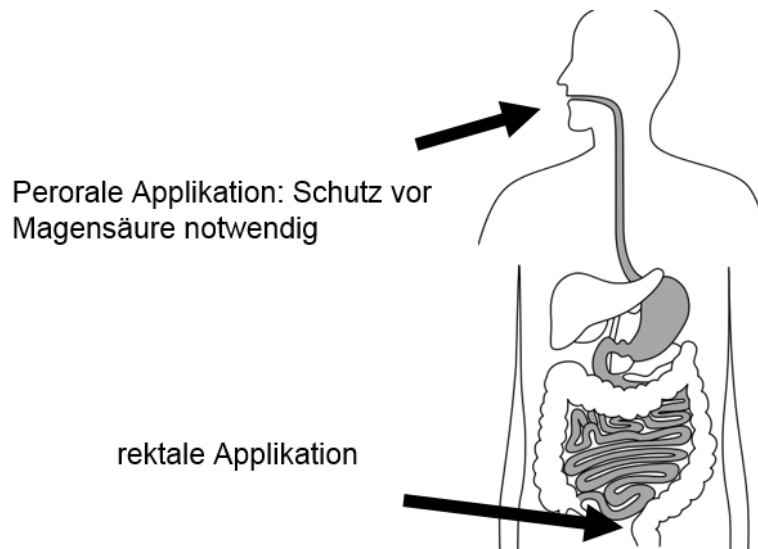


Abbildung 42: Mögliche Applikationswege für Nanopartikel in den Intestinaltrakt.

Bei der Entwicklung der beiden Transportvehikel wurde darauf geachtet, dass diese potentiell in der Maus angewendet werden könnten. Dieser Teil der Arbeit beschreibt die Eigenschaften und *in vitro*-Tests der mit funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln beladenen Transportvehikel. *In vitro* wurde dabei das grün fluoreszierende Protein eGFP in HeLa-eGFP-Zellen stummgeschaltet. Dazu wurden sowohl CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel als auch CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel verwendet.

3.3.1 Charakterisierung der Transportvehikel

Um die Partikel über eine perorale Vergabe in den Darm transportieren zu können, wurden gefriergetrocknete Calciumphosphat-Nanopartikel zunächst in eine Gelatine kapsel gefüllt. Dabei handelte es sich um eine Kapsel der Größe M. Die Kapseln haben laut Herstellerangaben einen Außendurchmesser von 1,27 mm und eine Länge von 8,4 mm und sind damit nach Beschichtung für den Transport in den Darm von Mäusen geeignet.¹⁷¹ Jedoch wird der Durchmesser des Übergangs von Magen zu Darm (*Pylorus*) von Mäusen in der Literatur auf 0,25-0,5 mm eingeschätzt.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Dies wäre für die Kapseln zu klein.

Um eine magensaftresistente Gelatine kapsel zu erhalten, musste diese mit einem magensaftresistenten Polymer beschichtet werden. Unter dem

Produktamen Eudragit® bietet die Firma Evonik Industries eine Reihe von Co-Polymeren auf der Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) an, die Wirkstoffe an gewünschten Orten des gastro-intestinal Traktes freisetzen sollen.⁹⁴ Dazu gehört das Polymer Eudragit® L 100, dessen Strukturformel in **Abbildung 43** abgebildet ist.

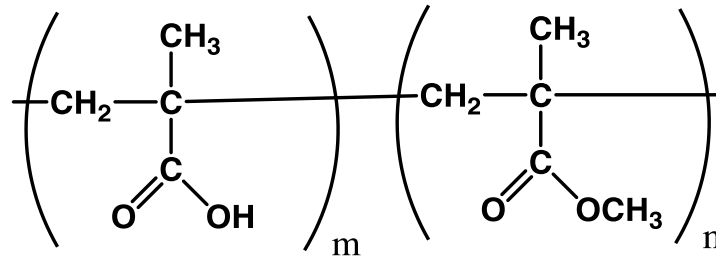


Abbildung 43: Strukturformel von Eudragit® L 100. Methylmethacrylsäure (m) und Methylmethacrylat (n) kommen im Verhältnis 1:1 vor. (Nachgezeichnet aus¹⁷⁵)

Aufgrund der Deprotonierung der Methylmethacrylsäureeinheiten ist das Polymer ab einem pH >6 wasserlöslich. Bei niedrigeren pH-Werten ist es wasserunlöslich. Der pH-Wert im Magen liegt typischerweise bei pH 1-2. Nach dem Essen kann der pH-Wert im Magen auch bis pH 5 ansteigen.^{94, 176, 177} Im Darm hingegen liegt der pH-Wert abhängig vom Darmabschnitt zwischen pH 6 und 8. Somit sollte das Polymer die Degradation der Kapsel im Magen verhindern. Durch den Anstieg des pH-Wertes im Darm würde sich das Polymer auflösen, infolgedessen würde sich die Kapsel ebenfalls auflösen und die Nanopartikel freisetzen.

Die Anwendung der beschichteten Gelatine-Kapsel zum Transport von Nanopartikeln wurde sowohl für das CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikelsystem als auch für das CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikelsystem *in vitro* getestet. Die Charakterisierung der beiden Partikelsysteme wurde in Abschnitt 3.2 beschrieben. Die Charakterisierung der mit funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln befüllten und mit Eudragit® L 100 beschichteten Kapsel ist in **Tabelle 4** für beide Partikelsorten zusammengefasst.

Tabelle 4: Charakterisierung der mit Nanopartikeln befüllten und mit Polymer beschichteten Kapsel. (\pm Standardabweichung)

Kapsel- gewicht	Inhalt Partikel + Trehalose / mg	Inhalt siRNA (CaP-siRNA- CaP-PEI) / μ g	Inhalt siRNA (CaP- PEI-siRNA-SiO ₂ -SH) / μ g	Eudragit- schicht / mg
2,3 \pm 0,5	2,6 \pm 0,6	5,2 \pm 1,8	8,5 \pm 3,5	3,1 \pm 1,1

Bevor die funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel in die Kapsel gefüllt wurden, wurden sie in Anwesenheit von Trehalose lyophilisiert. Die Trehalose dient hierbei als Kryoprotektor. Durch Zusatz von Trehalose ist es möglich, sowohl die Aktivität von Biomolekülen als auch die kolloidalen Eigenschaften von Dispersionen zu konservieren. Die Anwendung von in Gegenwart von Trehalose gefriergetrockneten und anschließend redispergierten, siRNA-funktionalisierten Nanostäbchen (Ostim®) bei der Genstummschaltung konnte zudem bereits gezeigt werden.^{134, 135, 178, 179}

Der gefriergetrocknete Lyokuchen konnte mit einem Trichter in die Gelatinekapseln gefüllt werden. Sowohl die leere als auch die befüllte Kapsel wurden mittels Feinwaage gewogen. Die Differenz der beiden Massen ließ auf den Anteil des Lyokuchens in der Kapsel schließen. Auch wurde die Masse des Lyokuchens vor dem Befüllen der Kapsel mittels Feinwaage bestimmt. Über den Anteil des Lyokuchens, der in die Kapsel gefüllt wurde, konnte die Masse an siRNA in der Kapsel errechnet werden. Bei beiden Partikelsorten war die eingefüllte Masse in etwa gleich, da die Trehalose den größten Teil des Lyokuchens ausmachte. Die leichten Abweichungen der Masse an siRNA in der Kapsel ergaben sich aus den unterschiedlichen Konzentrationen an siRNA in den ursprünglichen Partikeldispersionen.

Anschließend konnte die Kapsel in einem *dip-coating*-Verfahren mit Eudragit® L 100 beschichtet werden. Nach Verdampfen der Lösungsmittel wurde die Kapsel erneut gewogen. Über die Differenz der Massen der befüllten Kapsel und der befüllten und beschichteten Kapsel ließ sich wiederum die Masse an Eudragit® auf der Kapsel errechnen.

Gemäß Ph. Eur. (*Pharmacopeia Europe*) müssen magensaftresistente Arzneiformen mindestens 2 h im sauren Magenmilieu stabil bleiben (0,1 M HCl). Zudem wurde eine Schichtdicke von mindestens 50 μ m bestimmt, bei der mit

Eudragit® L 100 beschichtete Tabletten für 2 h im Sauren keine Flüssigkeit aufnehmen.^{93, 94, 176, 180}

Unter der Annahme einer zylinderförmigen Kapsel lässt sich die Oberfläche (A) der Kapsel über Formel (3) abschätzen:

$$A=L \cdot (2\pi r)+2 \cdot \pi r^2 \quad (4)$$

Dabei entspricht L der Länge der Kapsel (8,5 mm) und r ist der Radius (0,6 mm). Da die Dichte von Dichte von Eudragit® L 100 unbekannt war, wurde für weitere Berechnungen die Dichte von PMMA angenommen. Die Dichte von PMMA beträgt ca. 1,19 g cm⁻³.¹⁸¹ Anhand der Masse an Eudragit® auf der Kapsel und der Dichte von PMMA ließ sich das Volumen von Eudragit® auf der Kapsel abschätzen. Die Division von Volumen und Oberfläche ergab die Schichtdicke. Für eine Schichtdicke von 50 µm mussten somit mindestens 2 mg Eudragit® L 100 auf die Kapsel aufgetragen werden. Natürlich ist dies lediglich eine Abschätzung und setzt eine gleichmäßige Verteilung des Polymers auf der Kapsel voraus. Dennoch illustriert die Berechnung, dass die 3 mg Eudragit®, die auf der Kapsel waren, eine ausreichend dicke Schicht auf der Kapsel ausbilden sollten. In einem ersten Test (**Abbildung 44**) konnte zudem gezeigt werden, dass eine beschichtete Kapsel im sauren Milieu 2 h kein FITC-BSA freisetzte, während innerhalb von 80 min bei pH 7,1 (0,1 M Na₂HPO₄) der Inhalt der Kapsel komplett freigesetzt wurde. Die Freisetzung von FITC-BSA wurde hierbei durch UV/Vis-spektrometrische Messungen verfolgt.

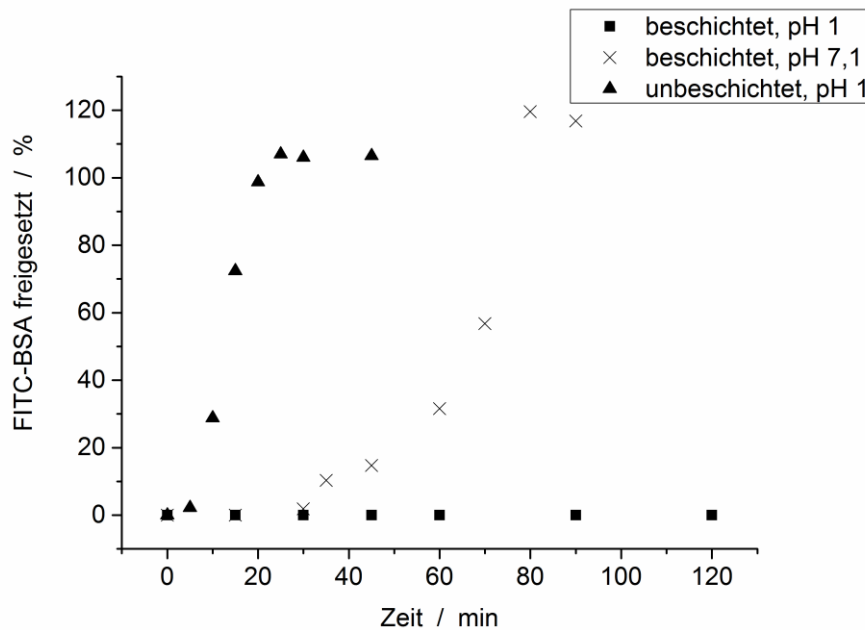


Abbildung 44: Freisetzung von FITC-BSA aus einer mit Eudragit® L 100 beschichteten Kapsel und aus einer unbeschichteten Kapsel bei unterschiedlichen pH-Werten.

Alternativ zur peroralen Applikation besteht die Möglichkeit, funktionalisierte Nanopartikel zur therapeutischen Anwendung bei chronischen Darmerkrankungen rektal zu applizieren. So wurden die Nanopartikel, die in Abschnitt 3.2 therapeutische Effekte im DSS-*Colitis*-Mausmodell zeigten, ebenfalls rektal appliziert. Hierbei wurde jedoch eine flüssige Nanopartikeldispersion rektal verabreicht.

Ein Nachteil der rektalen Applikation besteht darin, dass so nicht alle Darmabschnitte erreicht werden können. Während bei *Colitis ulcerosa* Entzündungen vorwiegend im Kolon entstehen, kann bei *Morbus Crohn* der komplette Gastro-Intestinal-Trakt betroffen sein.¹⁸² Bei rektaler Applikation wäre die Anwendung der Nanopartikel daher also auf *Colitis ulcerosa* beschränkt. Zur rektalen Applikation der funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel wurde ein Zäpfchen entwickelt. Hierbei wurden die Partikel in Hartfett dispergiert und in eine Zäpfchenform gebracht. Die Herstellung der Zäpfchen ist in Abschnitt 6.4 ausführlich beschrieben. Abweichend von dieser Beschreibung wurden die Zäpfchen für die *in vitro*-Versuche mittels eines Tygon-R39607-Schlauches (Innendurchmesser=0,95 mm) in Form gebracht. Hierdurch konnten kleinere Zäpfchen hergestellt werden, da in den *in vitro*-Versuchen nur geringe Mengen an siRNA benötigt wurden. Hierbei war das Verhältnis von Lyokuchen zu Fett

etwas höher, jedoch bewegte sich das Verhältnis in der gleichen Größenordnung wie in **Tabelle 5** (0,09 und 0,12). Die Angaben in **Tabelle 5** beziehen sich auf Zäpfchen, die für potenzielle *in vivo*-Versuche im Mausmodell entwickelt und optimiert wurden. Bei der Herstellung dieser Zäpfchen wurden Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-DNA-CaP-PEI) mit pcDNA3-eGFP funktionalisiert. Das Verhältnis der Massen an Lyokuchen und Hartfett wurde hierbei optimiert. Unabhängig von der Nukleinsäurefunktionalisierung wurden alle Calciumphosphat-Nanopartikel in Anwesenheit von $\sim 10 \text{ mg mL}^{-1}$ gefriergetrocknet. Der in **Tabelle 5** angegebene Gehalt an siRNA geht aus der Extrapolation des DNA-Gehaltes der optimierten Zäpfchen hervor. **Abbildung 45** zeigt jeweils ein Bild der Kapsel und des Zäpfchens.

Tabelle 5: Charakterisierung der Zäpfchen mit Nanopartikeln. (\pm Standardabweichung)

Länge / mm	Durchmesser / mm	Gesamtmasse / mg	Masse siRNA (CaP-siRNA- CaP-PEI) / μg	Masse siRNA (CaP-PEI-siRNA- SiO ₂ -SH) / μg
15-16	2	$50 \pm 3,3$	~ 16	~ 21

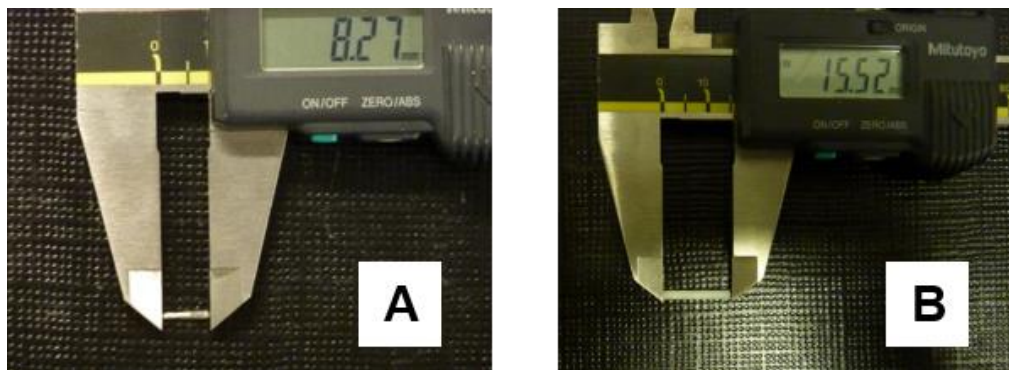


Abbildung 45: Bilder Kapsel (A) und des Zäpfchens (B).

Zäpfchen aus PEG 6000 und PEG 400 wurden mit dem Wirkstoff LMWH (*low molecular weight heparin*) erfolgreich zur Behandlung von *Colitis ulcerosa* im Mausmodell eingesetzt.¹⁸³ Die Maße des Zäpfchens sind jedoch nicht bekannt, sodass ein Vergleich mit den entwickelten Zäpfchen nicht möglich war.

3.3.2 Kolloidchemische Untersuchung der Partikelfreisetzung aus der Gelatinekapsel

Um den Schutz der Partikel durch die beschichtete Kapsel nachzuweisen, sollte zunächst die Freisetzung der Partikel aus der Kapsel nachgewiesen werden. Die Freisetzung der Partikel sollte hierbei durch DLS-Messungen charakterisiert werden. Die kolloidale Stabilität der Dispersion nach Freisetzung aus dem Zäpfchen wurde nicht untersucht, da die Trennung von Fetttröpfchen aus der wässrigen Phase nicht komplett möglich war. Außerdem musste das Zäpfchen keine Schutzfunktion vor Säure erfüllen.

Gefriergetrocknete Partikel wurden in die Gelatinekapseln gefüllt und mit Eudragit® L 100 beschichtet. Nach der Freisetzung aus der Kapsel wurden die Partikel mittels DLS charakterisiert. Zum Vergleich wurden die Partikel direkt nach der Synthese ebenfalls mittels DLS charakterisiert. Die Ergebnisse der DLS-Messungen sind in **Abbildung 46** dargestellt.

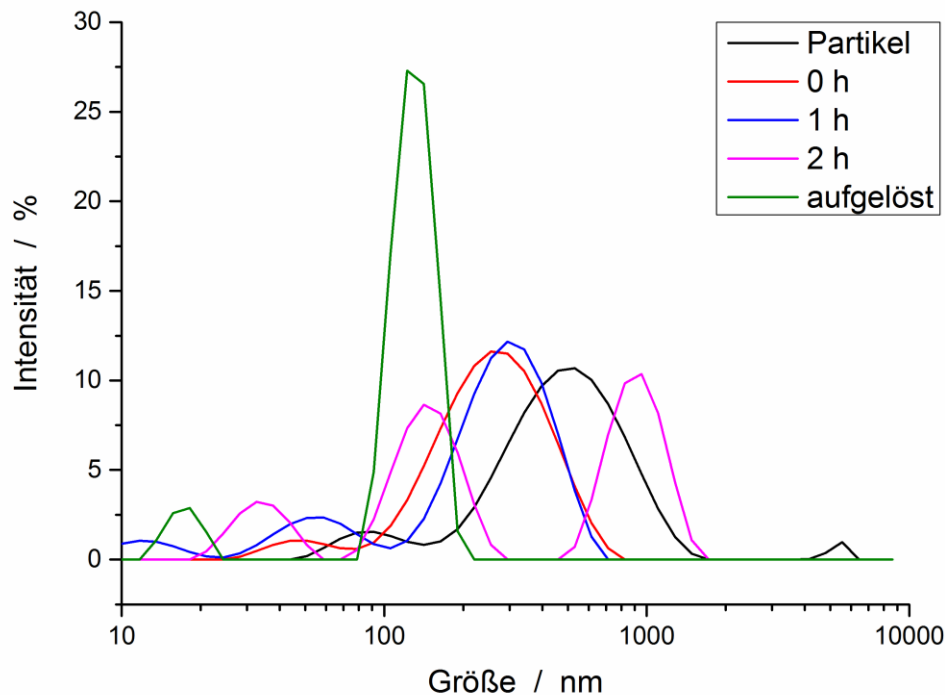


Abbildung 46: DLS-Messungen von Calciumphosphat-Nanopartikeln, die aus einer Gelatine kapsel freigesetzt wurden. Partikel – Größenverteilung nach der Synthese; 0 h – eine mit Partikeln befüllte Kapsel wurde beschichtet und nach 0 h Inkubation in HCl zerschnitten. Die Partikel wurden in Wasser aufgenommen und im DLS vermessen; 1 h – die Kapsel wurde nach 1 h Inkubation in HCl zerschnitten. Die Partikel wurden in Wasser aufgenommen und im DLS vermessen; 2 h – die Kapsel wurde nach 2 h Inkubation in HCl zerschnitten. Die Partikel wurden in Wasser aufgenommen und im DLS vermessen; aufgelöst – die Kapsel wurde nach 0 h Inkubation in HCL in MOPS-Puffer (0,15 M, pH 7,1) aufgelöst und mittels DLS vermessen.

Zunächst wurde eine beschichtete und mit Nanopartikeln befüllte Kapsel in MOPS-Puffer (0,15 M, pH 7,1) aufgelöst. Die Kapsel wurde zuvor nicht in HCl inkubiert. Sowohl die Intensität als auch die mittlere Größenverteilung (*z-average*) der detektierten Partikel unterschieden sich wesentlich von der ursprünglichen Größenverteilung der Partikel, die direkt nach der Synthese vermessen wurden. Die Qualität der Messung wurde zudem von der Software als schlecht bewertet. Desweiteren veränderte sich das Zetapotenzial von +18 mV auf -11 mV. Dies legte die Vermutung nahe, dass gelöste Bestandteile der Kapsel oder des Eudragit® die DLS-Messung beeinflussten. Das gemessene Signal konnte somit nicht einwandfrei den Partikeln zugeordnet werden.

Im Folgenden wurden daher die Kapseln vor der Messung zerschnitten und der Lyokuchen in Wasser aufgenommen. Die Kapsel löste sich nicht im Wasser, und

die Stücke konnten durch kurzes Zentrifugieren von der Dispersion getrennt werden. Wurde die Kapsel zuvor in HCl inkubiert, so wurde sie vor dem Zerschneiden wieder getrocknet.

Die Messungen nach 0 h Inkubation und nach 1 h Inkubation in HCl wiesen jeweils ein Signal auf, das sowohl in der Intensität des Streulichtes als auch in der Position des Peaks mit der Messung nach der Synthese vergleichbar war. Das Zetapotenzial hingegen wich von der Vergleichsmessung ab (-3 mV und 5 mV). Das Eudragit® L 100 liegt in gelöster Form als Polyanion vor und könnte daher mit den positiv geladenen Partikeln wechselwirken. Dies würde zu einer Verringerung bzw. Umladung des Zetapotenzials führen. Liegt ein Teil des Eudragit® nach Zerschneiden der Kapsel in Lösung vor, so ließe sich die Abnahme des Zetapotenzial erklären. Die Messung nach 1 h Inkubation in HCl wies mehrere deutliche Peaks auf und die Qualität der Ergebnisse wurde von der Software als schlecht bewertet, da der Fehler des Kumulantenfits zu hoch war. Dennoch lag die Vermutung nahe, dass die kolloidalen Eigenschaften der Dispersion nach Freisetzung aus den Kapseln teilweise erhalten blieben. Der Vergleich war ohnehin schwierig, da schon die Vergleichsmessung Polydispersität aufwies. Dennoch konnten Einflüsse der Kapsel und des Eudragit® L 100 durch das Zerschneiden der Kapsel vor der Messung verringert werden.

Nach 2 h Inkubation in HCl wies die DLS Messung 3 Peaks auf. Die Software bewertete die Messergebnisse wiederum aufgrund des schlechten Kumulantenfits als unzureichend. Die mittlere Partikelgrößenverteilung (*z-average*) hingegen war wieder im gleichen Größenbereich der Vergleichsmessung. Das Zetapotenzial hingegen war wiederum geringer (3 mV). Die DLS-Messungen konnten den Schutz der Kapsel und die Freisetzung der Partikel zwar nicht beweisen. Tendenziell deuteten die Ergebnisse jedoch einen Schutz an. Mehr ließ sich aus den Daten nicht ablesen, da die Aussagekraft der DLS-Messungen hier an ihre Grenzen stieß. So sind DLS-Messungen polydisperser Dispersionen von vornherein schwierig zu interpretieren, da große Partikel mit höherer Intensität streuen als kleine. Hinzu kommt, dass Teile der Kapsel auch nach Zerschneiden und Zentrifugieren die Messung noch beeinflussen könnten und in der Größenverteilung nicht mehr von Calciumphosphat-Nanopartikeln zu unterscheiden wären. Auch die Konzentration

der Dispersion könnte die Messergebnisse beeinflussen. So ist es möglich, dass sich nur ein Teil der Partikel redispergieren ließ und somit die Konzentration geringer war als in der Vergleichsdispersion. Auch dies könnte Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung begründen. So ist die Streulichtintensität nicht nur von der Größe der Partikel abhängig, sondern auch von der Konzentration. Hinzu können interpartikuläre Wechselwirkungen bei hohen Partikelkonzentrationen auftreten, sowie ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei geringen Partikelkonzentrationen.⁹⁶

3.3.3 *In vitro* Untersuchungen der Transportvehikel

Die DLS-Messungen deuteten an, dass die kolloidalen Eigenschaften (Ausnahme Zetapotenzial) der Dispersion nach der Freisetzung aus der Kapsel erhalten blieben. Im nächsten Schritt sollte der biologische Effekt der Partikel nach Freisetzung aus der Kapsel und nach Freisetzung aus dem Zäpfchen untersucht werden. Hierbei wurden sowohl das CaP-siRNA-CaP-PEI-System als auch das CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-System zur Stummschaltung von eGFP in HeLa-eGFP-Zellen untersucht. Zur Analyse des biologischen Effektes der aus den Transportvehikeln freigesetzten Partikel wurde jeweils die Expression an eGFP von mit Partikeln behandelten Zellen mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Die relative Expression an eGFP wurde mittels qPCR bestimmt. Im Fall der CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel wurden in jedem Experiment 4 µg siRNA pro well mit Nanopartikeln zu den Zellen gegeben. **Abbildung 47** zeigt die Stummschaltungseffizienz der CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel nach der Freisetzung qualitativ. Neben der unbehandelten Kontrolle sind hierbei nur die Ergebnisse nach der Freisetzung aus der beschichteten Kapsel und aus dem Zäpfchen gezeigt.

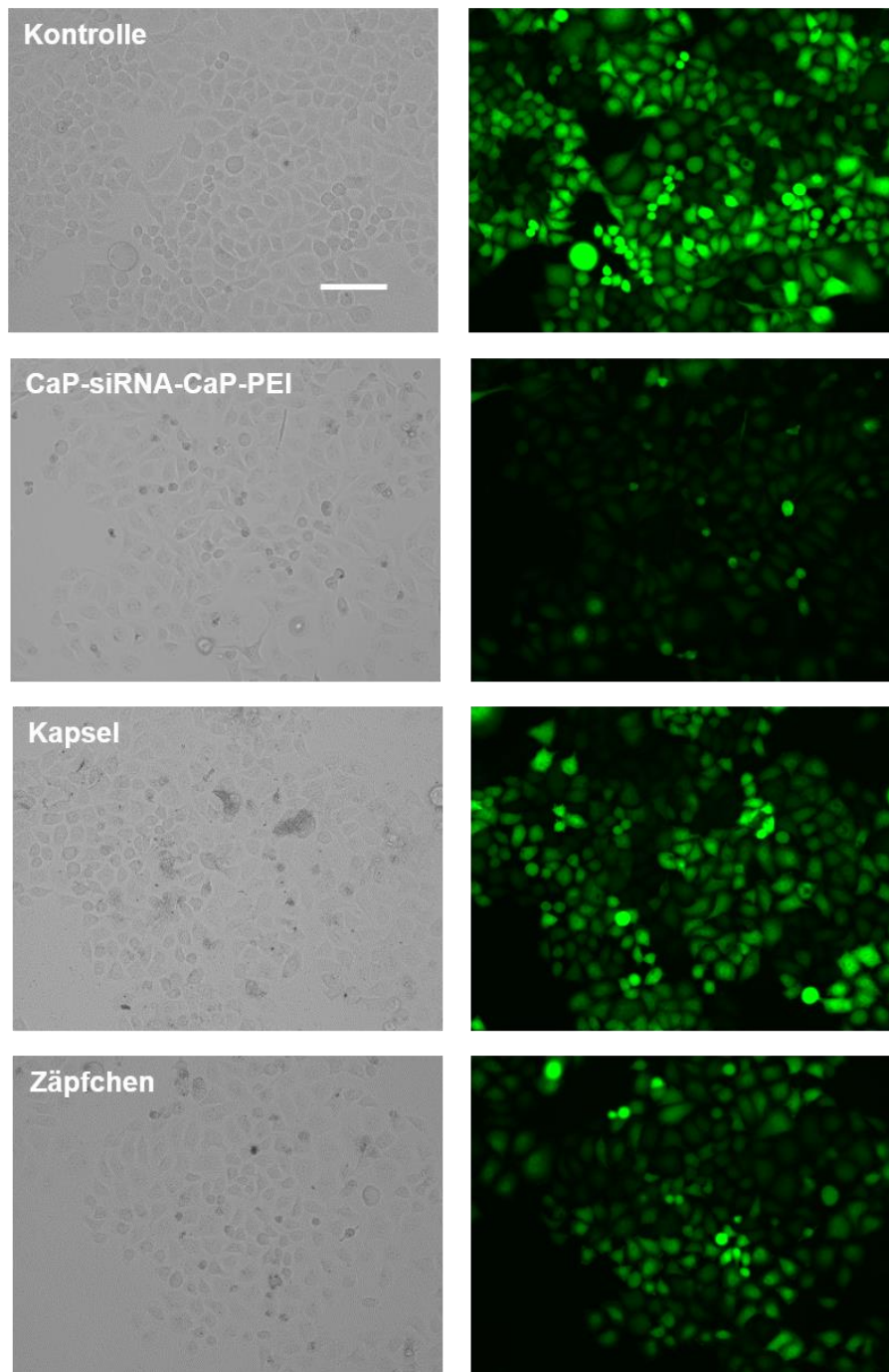


Abbildung 47: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Bilder von HeLa-eGFP-Zellen nach Inkubation mit CaP-siRNA-CaP-PEI-Nanopartikeln. Unbehandelte Kontrolle; gefriergetrocknete CaP-siRNA-PEI-Partikel die Medium redispergiert wurden; CaP-siRNA-PEI-Partikel nach der Freisetzung aus einer beschichteten Kapsel; CaP-siRNA-PEI-Partikel nach Freisetzung aus einem Zäpfchen. Vergrößerung 20x; Die Skala entspricht 100 μm .

Die Belichtungszeit wurde bei allen Fluoreszenzaufnahmen konstant gehalten, um die Vergleichbarkeit der Aufnahmen zu verbessern. Qualitative Unterschiede der eGFP-Expression nach der Freisetzung von Partikeln aus den Transportvehikeln und der unbehandelten Kontrolle waren anhand der Bilder

(Abbildung 47) nur schwer auszumachen. Deutlich wurde jedoch, dass die Partikel, die aus den Transportvehikeln freigesetzt wurden, geringere Genstummschaltungseffizienzen aufwiesen, als die Partikel ohne Transportvehikel. Quantitativ wurde die Genstummschaltung mittels qPCR ausgewertet. Diese Ergebnisse sind in **Abbildung 48** zusammengefasst.

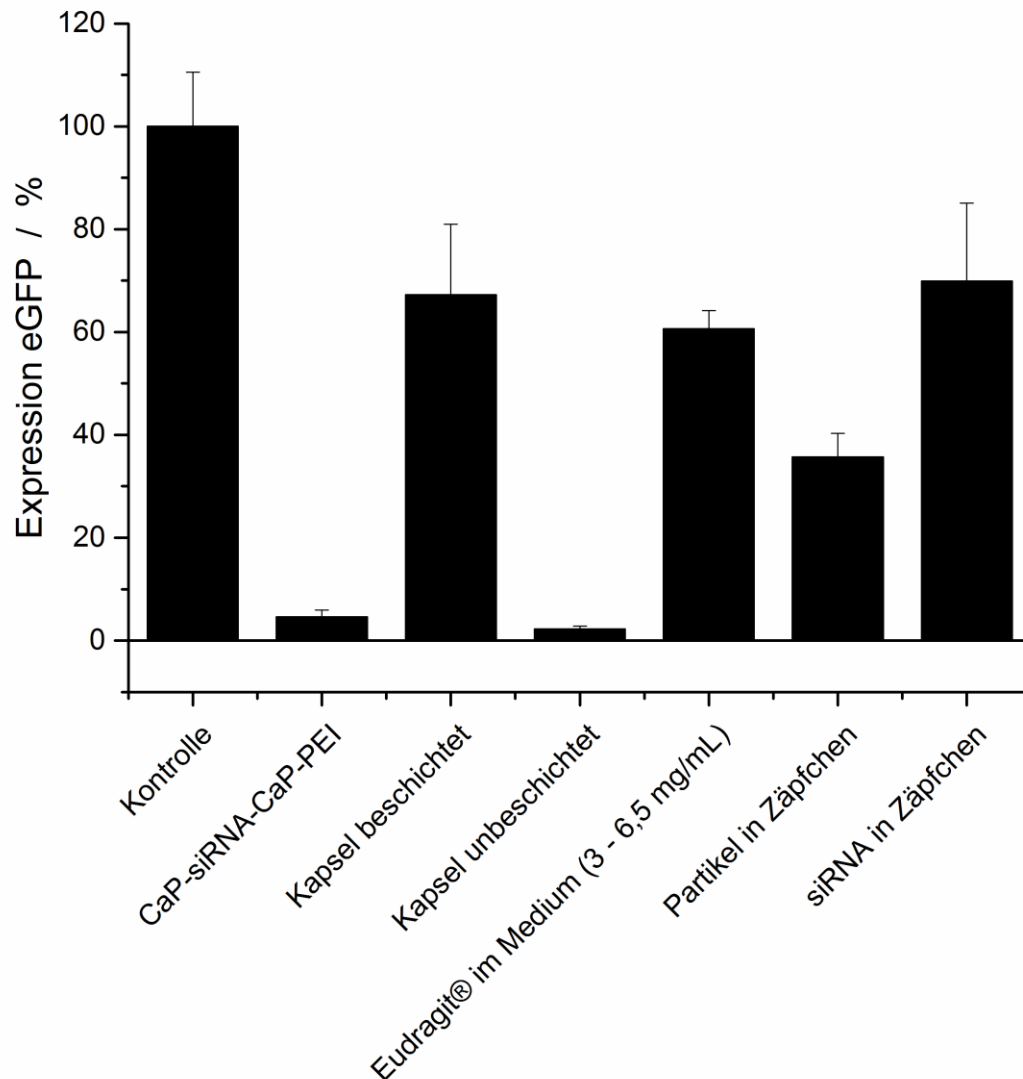


Abbildung 48: Expression von eGFP nach Inkubation von HeLa-eGFP-Zellen mit CaP-siRNA-CaP-PEI-Nanopartikeln. Pro well wurden 4 µg siRNA verwendet. Die Partikel wurden zuvor aus einer Kapsel oder einem Zäpfchen freigesetzt oder in Medium bzw. Medium mit Eudragit® L 100 redispergiert. Die Expression von eGFP wurde mittels qPCR quantifiziert. (± Standardfehler)

Zunächst wurden gefriergetrocknete Partikel in Zellkulturmedium (DMEM + FBS + P/S + Geneticin) redispergiert. Die Stummschaltung von eGFP war mit den vorherigen Ergebnissen vergleichbar (siehe Abschnitt 3.2). Zudem wurde sowohl

eine mit Partikeln befüllte und mit Eudragit® L 100 beschichtete Kapsel als auch eine nur mit Partikeln befüllte Kapsel in Zellkulturmedium aufgelöst. Anschließend wurden die Partikel zu den Zellen gegeben. Zum Vergleich wurden Partikel in Zellkulturmedium, das 3-6,5 mg mL⁻¹ Eudragit® L 100 enthielt, redispergiert und zu den Zellen gegeben. Die Konzentration von 3-6,5 mg mL⁻¹ Eudragit® entsprach dabei in etwa der Konzentration an Eudragit®, die nach Auflösen der beschichteten Kapsel im Medium vorlag. Zum Lösen des Eudragit® wurde dem Zellkulturmedium jeweils MOPS-Puffer zugesetzt (Endkonzentration im Medium 20 mM), um den pH-Wert des Mediums konstant zu halten. Die Genstummschaltungseffizienz wurde innerhalb dieser Konzentrationen an Eudragit® nicht unterschiedlich vom Polymer beeinflusst. Daher wurden die Ergebnisse zusammengefasst. Während die Stummschaltungseffizienz nach Freisetzung der Partikel aus der unbeschichteten Kapsel der Stummschaltungseffizienz der nur redispergierten Partikel entsprach, war bei Anwesenheit von Eudragit® L 100 die Stummschaltungseffizienz stark vermindert. Dies legte die Vermutung nahe, dass das Eudragit® L 100 die Genstummschaltungseffizienz der positiv geladenen Partikel negativ beeinflusste. So lag die Expression an eGFP nach Inkubation mit Partikeln und Eudragit® L 100 zwischen 60 % und 70 %. Weiterhin wurden Partikel aus einer beschichteten und zuvor in 0,1 M HCl inkubierten Kapsel freigesetzt. Auch in diesen Versuchen lag die Expression an eGFP zwischen 60 % und 70 %. Die Ergebnisse sind aus Gründen der Übersichtlichkeit jedoch nicht gezeigt.

Auch war die Genstummschaltungseffizienz der Partikel nach Freisetzung aus dem Zäpfchen stark vermindert. Jedoch lag die Expression an eGFP mit unter 40 % niedriger, als in Anwesenheit von Eudragit®. Außerdem wurde die Expression von eGFP wesentlich stärker von einem Zäpfchen inhibiert, das funktionalisierte Nanopartikel enthielt, als von einem Zäpfchen, das nur siRNA enthielt.

Wie oben bereits erwähnt wurde, wurde außerdem die Stummschaltungseffizienz von CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln untersucht, die aus den Transportvehikeln freigesetzt wurden. **Abbildung 49** zeigt qualitativ die Stummschaltung von eGFP in HeLa-eGFP-Zellen.

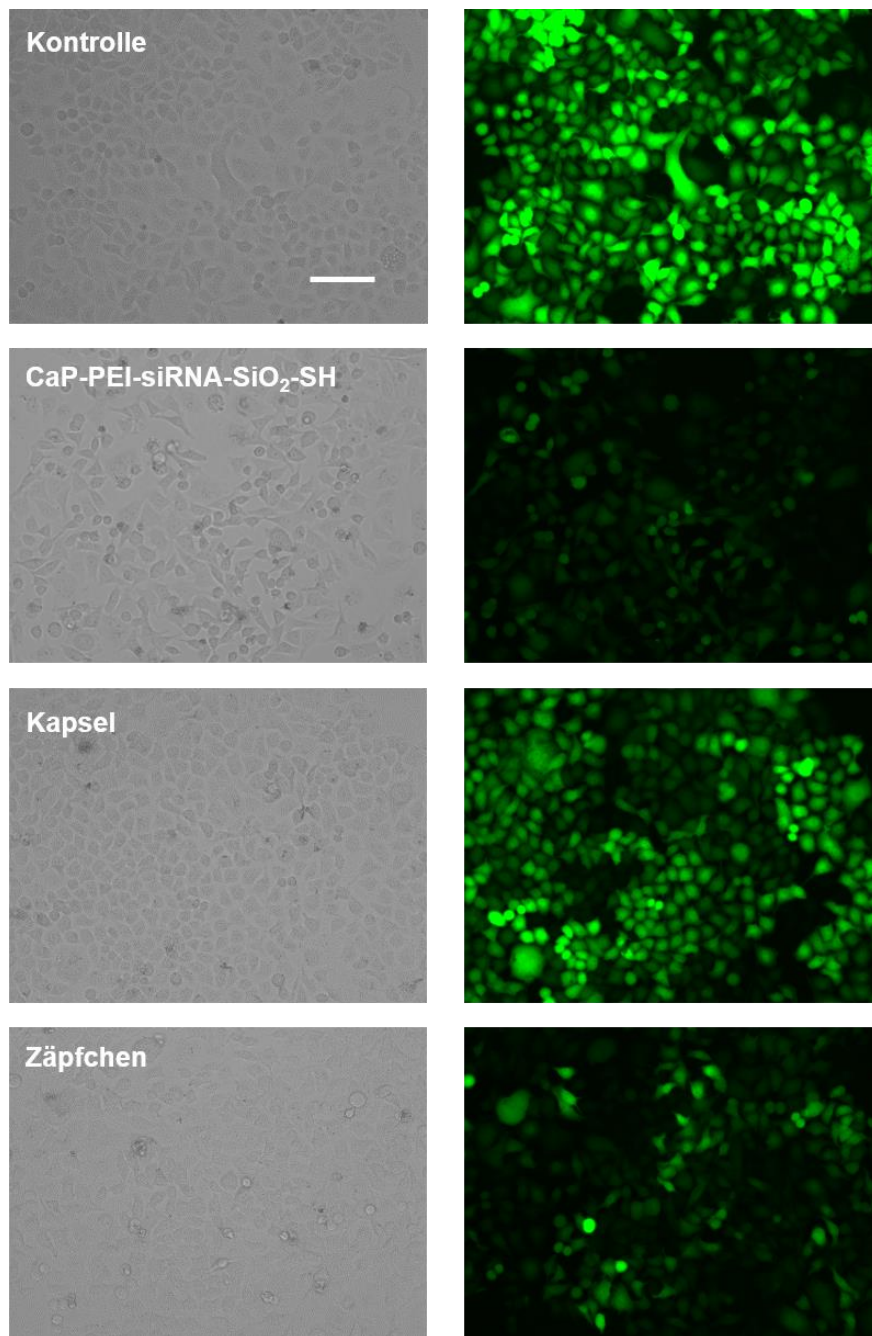


Abbildung 49: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Bilder von HeLa-eGFP-Zellen nach Inkubation mit CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Nanopartikeln. Unbehandelte Kontrolle; gefriergetrocknete CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel, die in Medium redispergiert wurden; CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel nach der Freisetzung aus einer beschichteten Kapsel; CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel nach Freisetzung aus einem Zäpfchen. Vergrößerung 20x; die Skala entspricht 100 µm.

Während die Partikel, die aus einer beschichteten Kapsel freigesetzt wurden, qualitativ erneut kaum einen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle zeigten, schienen die Partikel, die aus dem Zäpfchen freigesetzt wurden eGFP stummzuschalten. CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel, die in Medium redispergiert

wurden, zeigten qualitativ erneut die besten Genstummschaltungseffekte. Die quantitative Analyse der Stummschaltung wurde wieder mittels qPCR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 50** zusammengefasst.

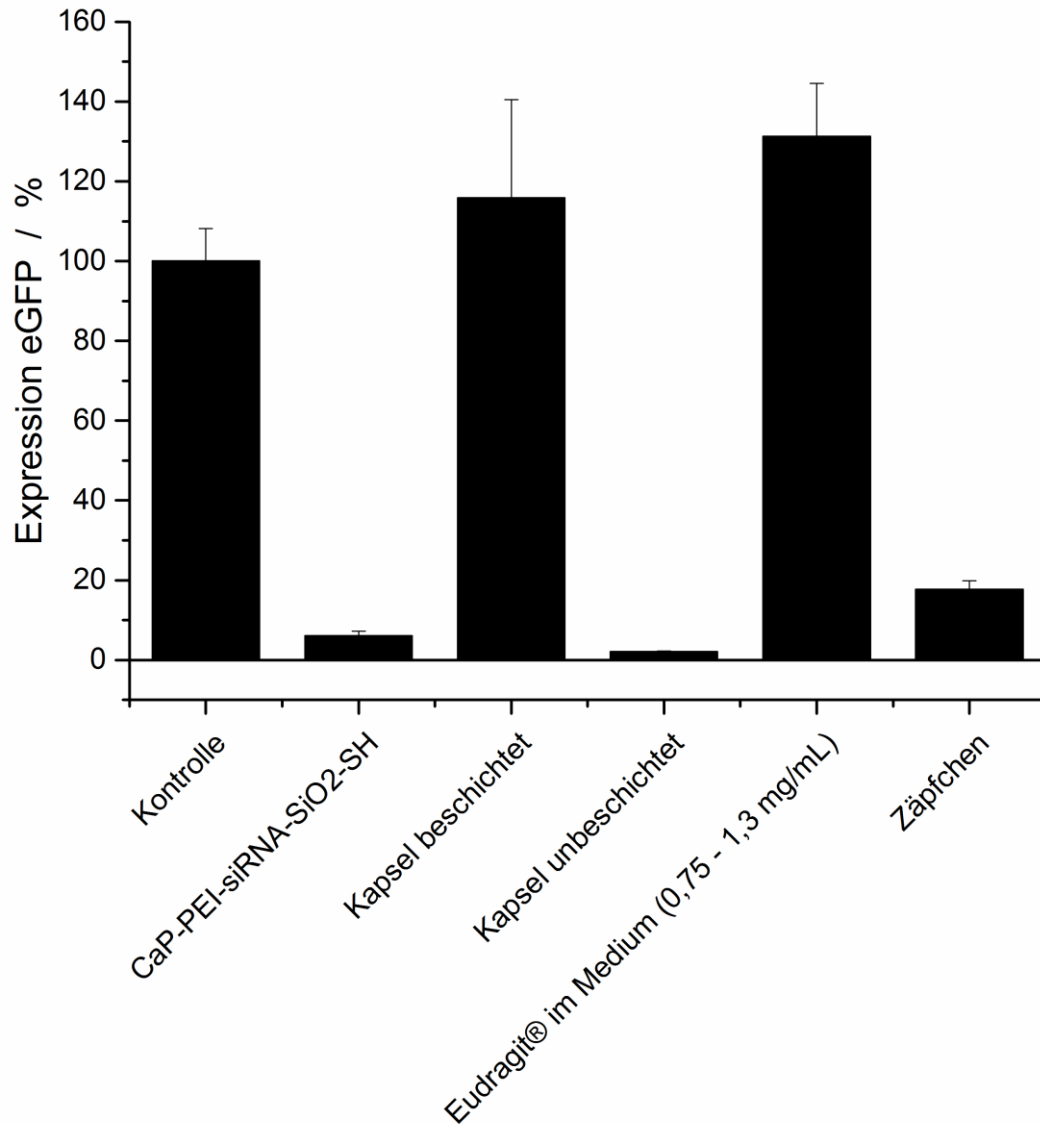


Abbildung 50: Expression von eGFP nach Inkubation von HeLa-eGFP-Zellen mit CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Nanopartikeln. Pro *well* wurden 2 µg siRNA verwendet. Die Partikel wurden zuvor aus einer Kapsel oder einem Zäpfchen freigesetzt oder in Medium bzw. Medium mit Eudragit® L 100 redispergiert. Die Expression von eGFP wurde mittels qPCR quantifiziert. (± Standardfehler)

Ähnlich wie bei den CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln inhibierte das Eudragit® L 100 auch beim CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-System die Stummschaltung. Erneut wurde

die Stummschaltung von Partikeln, die aus einer beschichteten Kapsel durch Auflösen der Kapsel freigesetzt wurden, mit in Zellkulturmedium redispergierten Partikeln und Partikeln, die in Zellkulturmedium mit Eudragit®-Zusatz redispergiert wurden, verglichen. Die Konzentration an Eudragit®, die zuvor in Zellkulturmedium gelöst wurde, war diesmal geringer als bei dem CaP-siRNA-CaP-PEI-System. Da einerseits die Konzentration an siRNA auf den CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln etwas höher war und andererseits die Menge an siRNA pro *well* verringert wurde, konnte auch die Kapsel in einem größeren Volumen an Medium aufgelöst werden. Dadurch verringerte sich die Konzentration an Eudragit® nach Auflösen der Kapsel. Wurde das Eudragit® jedoch vorher im Medium gelöst, sollte die Konzentration in etwa der Konzentration nach Auflösen einer beschichteten Kapsel entsprechen.

Das Eudragit® schien bei diesem System stärkeren Einfluss auf die Stummschaltungseffizienz zu nehmen. Während bei dem CaP-siRNA-CaP-PEI-System in Anwesenheit von Eudragit® noch sehr geringe Stummschaltungseffizienzen mittels qPCR messbar waren, wurde bei dem CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-System eine Überexpression an eGFP festgestellt.

Nach der Freisetzung aus dem Zäpfchen hingegen zeigten die CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel immer noch hohe Stummschaltungseffizienzen. Auch bei diesem System wurde die Effizienz der Stummschaltung jedoch durch das Zäpfchen verringert.

Die Toxizität der aus den Transportvehikeln freigesetzten Partikel wurde im Fall der CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel mittels MTT-Test untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Abbildung 51** zusammengefasst. Hierbei wurde jeweils die Vitalität der Zellen nach Behandlung mit Nanopartikeln, die aus den Transportvehikeln freigesetzt wurden, bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Menge an Nanopartikeln pro *well* konstant war. Jedoch konnte nicht bestimmt werden, ob tatsächlich alle Partikel, die in den Transportvehikeln waren, auch wieder freigesetzt wurden. Die Toxizität der Transportvehikel ohne Partikel wurde nicht untersucht.

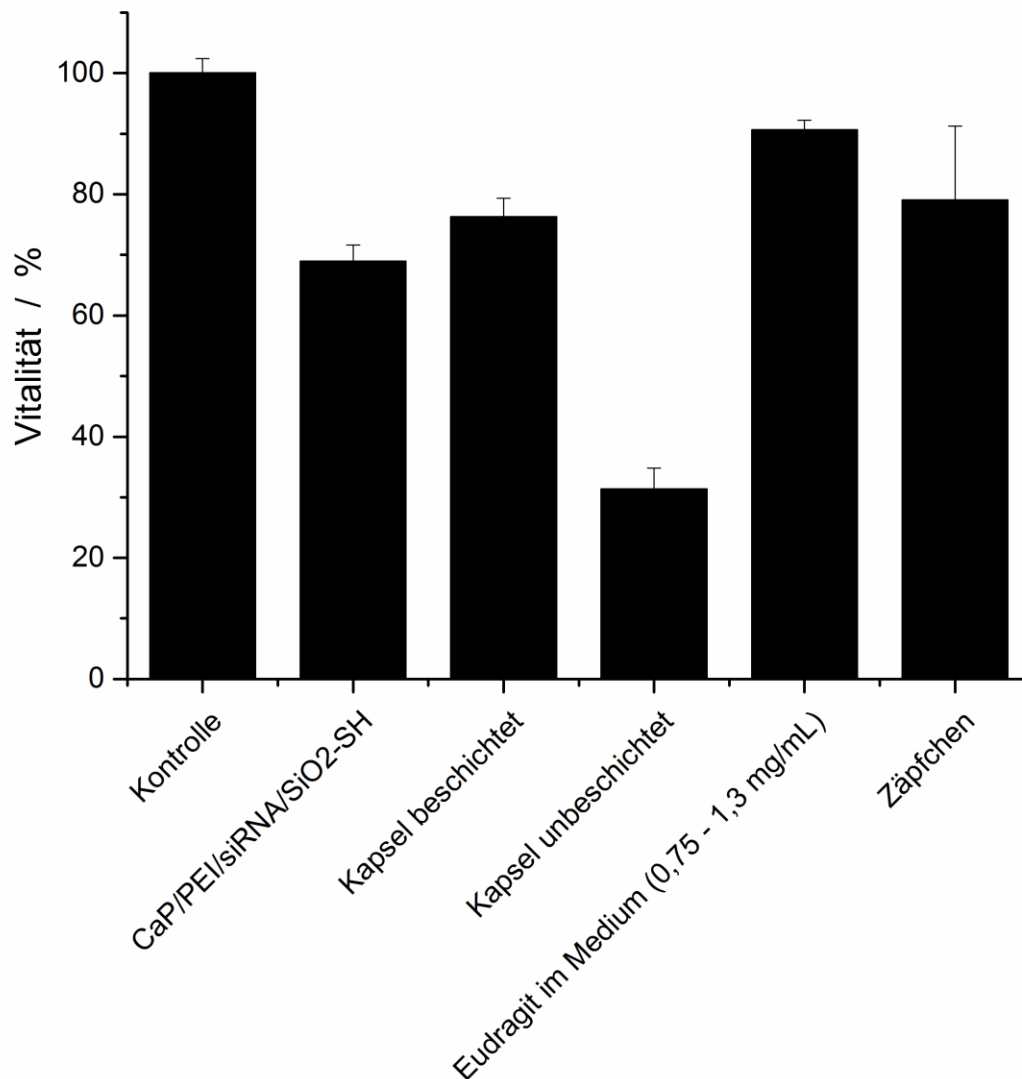


Abbildung 51: Vitalität von HeLa-eGFP-Zellen, die mit redispergierten CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln oder nach Freisetzung aus einer Kapsel oder einem Zäpfchen behandelt wurden. Die Vitalität wurde mittels MTT-Test bestimmt. (± Standardfehler)

Partikel, die in Anwesenheit von Eudragit® L 100 zu den Zellen gegeben wurden, wiesen keine höhere Toxizität auf, als nur redispergierte Partikel. Dies ist aus den Experimenten mit der beschichteten Kapsel und zuvor in Medium gelösten Eudragit® ersichtlich. Auch Partikel, die aus einem Zäpfchen freigesetzt wurden, waren nicht toxischer. Partikel, die jedoch aus einer unbeschichteten Kapsel freigesetzt wurden, wiesen erhöhte Toxizität auf. Dies kann einerseits an toxischen Effekten der unbeschichteten Kapsel liegen. Andererseits ist die Menge an Partikeln innerhalb der Kapsel schwierig zu bestimmen. Wurde die Menge an Partikeln innerhalb der Kapsel nun unterschätzt, könnte die erhöhte

Toxizität von einer höheren Nanopartikeldosis ausgehen. Das Eudragit® hingegen inhibierte den Genstummschaltungseffekt der Partikel. Gleichzeitig schienen die toxischen Auswirkungen der Partikel durch Eudragit® abgeschwächt zu werden. Sollte Toxizität auch von der Kapsel ausgehen, so wurden auch diese Auswirkungen durch Anwesenheit von Eudragit® abgeschwächt.

Da sowohl die Toxizität der Partikel als auch die Genstummschaltungseffizienz in Anwesenheit von Eudragit® L 100 verändert wurde, schien eine Interaktion zwischen Polymer und Nanopartikeln vorzuliegen. Da das Polymer im gelösten Zustand negativ geladen ist, ist eine elektrostatische Interaktion mit den positiv geladenen Nanopartikeln wahrscheinlich. Neben Methylacrylsäure-basierten Beschichtungen wie Eudragit® L 100 existieren weitere Polymere, die als magensaftresistente Überzüge dienen. Dazu gehören unter anderem Hydroxypropylmethylcellulosephthalat (HPMCP), Celluloseacetatphthalat (CAP) und Carboxymethylcellulose (CMC). Diese Beschichtungen zeichnen sich jedoch alle durch Carbonsäurefunktionen aus, die die pH-abhängige Löslichkeit bewirken. In gelöstem Zustand liegen diese Polymere also alle als Polyanion vor.⁹³ Diese sollte also auf ähnliche Weise mit den positiv geladenen Nanopartikeln interagieren. Andererseits könnten negativ geladene Partikel mit diesen Polymeren kombiniert werden. So wurden beispielsweise negativ geladene PLGA-Nanopartikel erfolgreich mit Eudragit® FS30D, einem weiteren magensaftresistenten Eudragit®, überzogen und im Darm resorbiert, um Vakzine zu freisetzen.¹⁸⁴ Negativ geladene Calciumphosphat-Nanopartikel wiesen jedoch bei Stummschaltungsversuchen geringere Effizienzen als positiv geladene Partikel auf (siehe Abschnitt 3.2). Auch war die Genstummschaltungseffizienz von negativ geladenen PLGA-Nanopartikeln im Vergleich mit positiv geladenen reduziert.⁴⁶ Jedoch konnten mit siRNA beladene PLA-Nanopartikel mit einem leicht positiven Zetapotenzial von *Laroui et al.* in ein Hydrogel aus Chitosan und Alginat eingeschlossen werden. Das Hydrogel wurde dabei erst im Magen gebildet. Mithilfe dieses Hydrogels konnten die Nanopartikel intakt über orale Vergabe in den Darm transportiert werden.^{156, 165} Da das Hydrogel durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen vernetzt wird, ist es jedoch unter Umständen nicht mit CaP-Nanopartikeln verwendbar. Außerdem konnten Nanopartikel aus Gelatine durch Einschließen in Polycaprolacton(PCL)-Mikropartikel bis in den Darm gelangen und Effekte zeigen.^{145, 164} Die Gelatine

wurde dazu verwendet, hohe Konzentrationen an siRNA in PCL zu verkapseln. Aufgrund der hydrophoben Natur von PCL sollte die siRNA dann vor Nukleasen geschützt sein.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Die Freisetzung der siRNA sollte wiederum durch enzymatischen Abbau des PCL erfolgen. Ob das PCL auch einen ausreichenden Schutz vor Säure bietet, ist unbekannt. Einige Nanopartikelformulierungen waren von vornherein magensaftresistent und konnten im Darm von Zellen aufgenommen werden oder siRNA freisetzen.^{166, 188}

Zur Untersuchung der Gründe der Inhibition der Partikeleffekte wurden im nächsten Abschnitt weitere Studien durchgeführt.

3.3.4 Untersuchung der Interaktion zwischen Eudragit® und Partikeln

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass Eudragit® L 100 mit den positiv geladenen Calciumphosphat-Nanopartikeln interagiert und die Genstumschaltung inhibiert. Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Nanopartikeln und gelöstem Eudragit® wurden DLS-Messungen in Abhängigkeit der Eudragit®-Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 52** und **Abbildung 53** zusammengefasst.

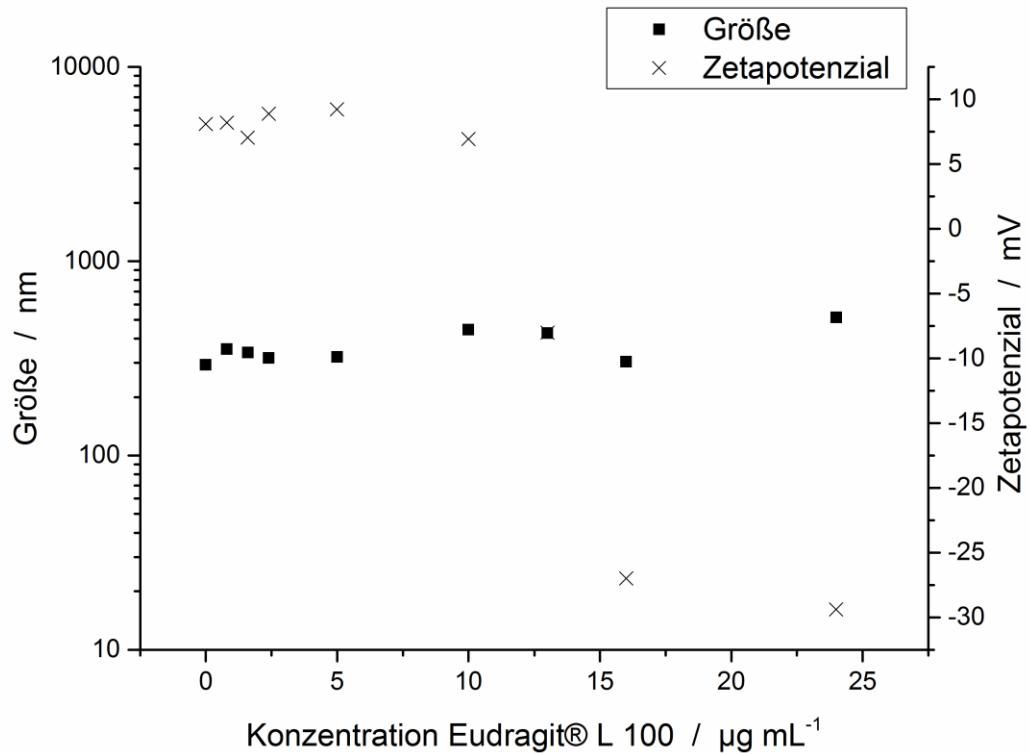


Abbildung 52: Größe und Zetapotenzial der CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel bei steigender Eudragit® L 100-Konzentration. Die Messungen wurden in MOPS-Puffer (0,15 M, pH 7,1) durchgeführt.

Während die Größe der CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel bei Zugabe von Eudragit® konstant war, änderte sich das Zetapotenzial schon bei geringen Mengen an Polymer. Die Umladung von positiv geladenen Partikeln zu negativ geladenen fand hier schon bei einer Konzentration an Eudragit® von $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ statt. Ein ähnliches Verhalten zeigten auch die CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel in Anwesenheit von Eudragit® L 100.

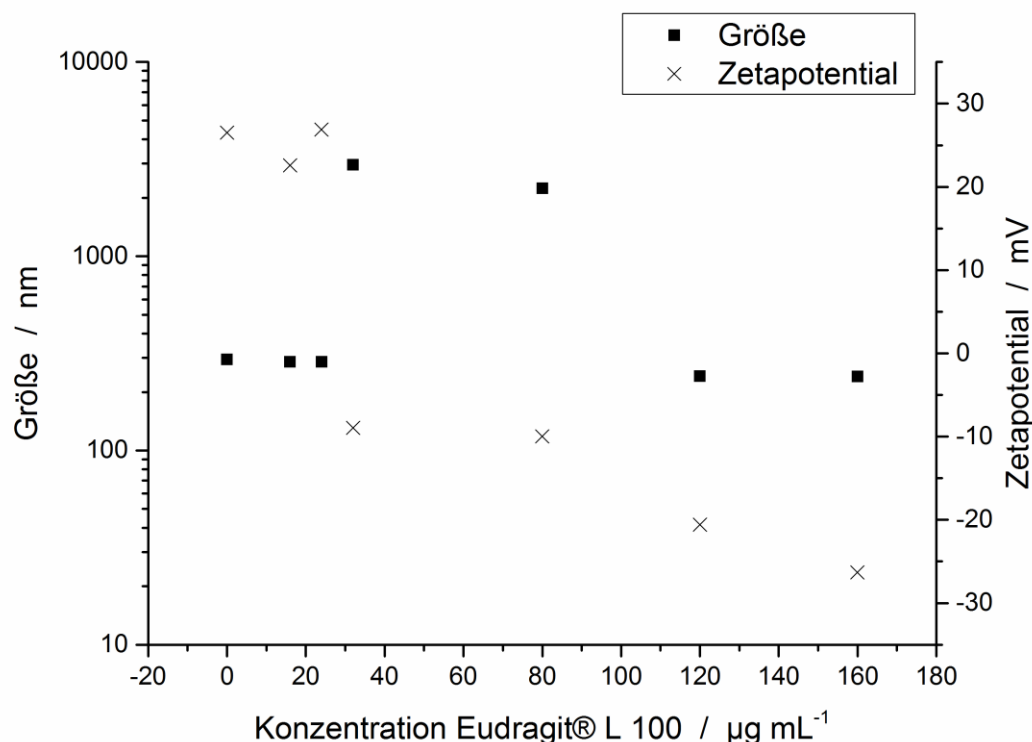


Abbildung 53: Größe und Zetapotenzial der CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikel bei steigender Eudragit® L 100-Konzentration. Die Messungen wurden in MOPS-Puffer (0,15 M, pH 7,1) durchgeführt.

Bei sehr geringen Konzentrationen an Eudragit® L 100 wurden Größe und Zetapotenzial der Partikel nicht beeinflusst. Ab einer Konzentration an Eudragit® von 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fand die Umladung der Partikel statt. Zunächst reichte das gering negative Zetapotenzial nicht zur Stabilisierung der Partikel aus und es kam zur Agglomeration. Dies äußerte sich durch den drastischen Anstieg der Größe. Die weitere Zugabe an Eudragit® verringerte das Zetapotenzial weiter und die Partikel ließen sich in ihrer ursprünglichen Größe stabilisieren, nun aber mit stark negativem Zetapotenzial.

Alle DLS-Messungen wurden bei den Titrations in MOPS-Puffer (0,15 M, pH 7,1) durchgeführt. Ohne Puffer würde das Eudragit® den pH-Wert erniedrigen, bis es nicht mehr löslich ist. Durch den Puffer wird einerseits ein konstanter pH-Wert gewährleistet, andererseits lässt sich mehr Eudragit® L 100 lösen.

Die beiden Titrations verdeutlichen die starke Interaktion der positiv geladenen Partikel mit dem gelösten Polymer. Die Inhibition der Genstummschaltung kann nun auf mehrere Mechanismen zurückgeführt werden. Einerseits könnte die Eudragit®-Hülle die Aufnahme der Partikel in die Zellen verhindern. Andererseits

könnten Partikel und Polymer nach Endozytose in den Lysosomen von Zellen landen. Die Säure in den Lysosomen würde dann wieder zu unlöslichem Eudragit® führen und dies würde wiederum die Auflösung der Calciumphosphat-Nanopartikel stören. Im nächsten Schritt könnten die Partikel dann ohne Freisetzung der siRNA aus den Zellen geschleust werden. Zur Untersuchung dieser Mechanismen wurden Aufnahmestudien in HeLa Zellen durchgeführt. Die Aufnahme der aus den Transportvehikeln freigesetzten Partikel ist in **Abbildung 54** dargestellt.

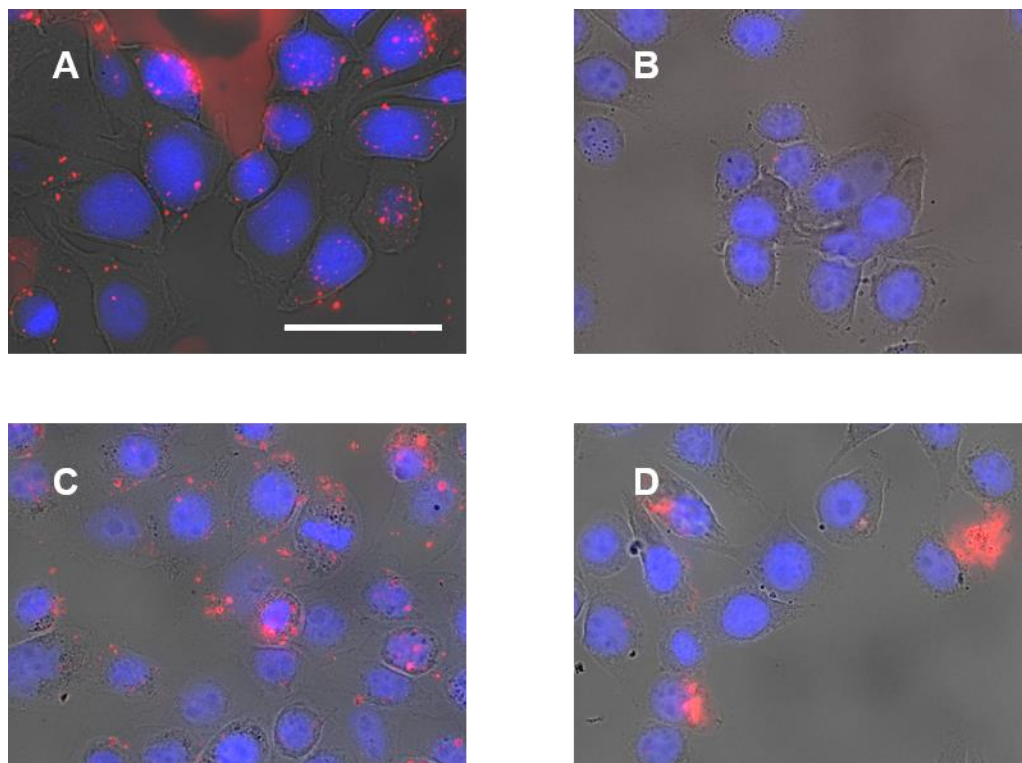


Abbildung 54: Aufnahme von aus den Transportvehikeln freigesetzten CaP-Oligo647-CaP-PEI-Partikel in HeLa-Zellen. A- gefriergetrocknete Partikel; B – 1 mg mL⁻¹ Eudragit® L 100 zuvor im Medium gelöst; C – Partikel, freigesetzt aus Zäpfchen; D – Partikel, freigesetzt aus beschichteter Kapsel. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und sind blau dargestellt. Durch Funktionalisierung mit Oligo647 fluoreszieren die Partikel und sind rot dargestellt. Die Umrisse der Zellen wurden im Lichtkanal aufgenommen. Die Skala entspricht 50 µm; Vergrößerung 100x.

CaP-Oligo647-CaP-PEI-Partikel wurden, wie schon in Abschnitt 3.2 beschrieben wurde, mit Oligo647 funktionalisiert, um im Fluoreszenzmikroskop detektierbar zu sein. Zur Kontrolle wurden gefriergetrocknete Partikel in Medium redispergiert und mit HeLa Zellen inkubiert (**Abbildung 54A**). Die Partikel zeigten nach 3 h Inkubation die erwartete Aufnahme in die Zellen. Desweiteren wurden Partikel in

DMEM mit 1 mg mL^{-1} an Eudragit[®] L 100 redispergiert (**Abbildung 54B**). In diesem Experiment war nun keine Aufnahme mehr zu detektieren, was darauf hindeutete, dass das Eudragit[®] schon die Aufnahme der Partikel verhindert. Aus Hartfett freigesetzte Partikel hingegen wurden wiederum von den Zellen aufgenommen (**Abbildung 54C**). Wurden die Partikel durch Auflösen einer beschichteten Kapsel freigesetzt (**Abbildung 54D**), so waren Partikel detektierbar. Jedoch war das Signal des Farbstoffes eher diffus. Es ist möglich, dass Partikel an Teilen der Kapsel, die nicht vollständig gelöst waren, adsorbiert wurden, und so für das Signal verantwortlich waren. Größere Agglomerate und Teile der Kapsel, die nun im Mikroskop sichtbar waren, könnten auf den Zellen adsorbiert vorliegen. Ob diese Agglomerate und Teile der Kapsel nun innerhalb oder außerhalb der Zellen vorlagen, ließ sich anhand dieser Bilder nicht klären. Jedoch war die Aufnahme redispergierter Partikel in Anwesenheit von Eudragit[®] schon inhibiert. Es ist also davon auszugehen, dass auch Partikel, die aus einer beschichteten Kapsel freigesetzt wurden, nicht aufgenommen wurden. Auch in **Abbildung 48** ist die Genstumschaltung von Partikeln, die in Anwesenheit von Eudragit[®] redispergiert wurden, und Partikeln, die aus einer beschichteten Kapsel freigesetzt wurden, gleich.

Bei allen Versuchen wurde Eudragit[®] bzw. die beschichtete Kapsel stets in Zellkulturmedium (DMEM + FBS + P/S, bei HeLa-eGFP Zellen + Geneticin) mit MOPS-Puffer (Endkonzentration 20 mM) aufgelöst. Dieses komplexe Medium wurde gewählt, um das Milieu im Darm möglichst gut zu simulieren. Die hohe Konzentration an Proteinen im Medium führte jedoch nicht zur Inhibierung der Interaktion zwischen Nanopartikeln und Eudragit[®]. Im Darm existieren natürlich noch eine Reihe anderer Stoffe, die die Interaktion unter Umständen inhibieren könnten. Aufgrund ihrer Größe konnten die Kapseln nicht im *in vivo*-Mausmodell getestet werden. Die Titration hingegen zeigte, dass schon geringe Konzentrationen an Eudragit[®] ausreichten, um die Partikel umzuladen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass das Eudragit[®] auch *in vivo* stören würde. Da beide Transportvehikel die Stumschaltungseffizienz der Partikel störten, wäre außerdem die Verwendung der unbeschichteten Kapsel als Zäpfchen denkbar. Jedoch könnte es sein, dass sich die unbeschichtete Kapsel bei dieser Anwendung zu langsam auflösen würde.

3.3.5 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wurde in diesem Abschnitt nach Strategien gesucht, um funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel unbeschadet in den Darm zu bringen. Zur peroralen Anwendung wurden Partikel in eine Gelatine kapsel gefüllt und mit dem pH-sensitiven Polymer Eudragit® L 100 überzogen. Durch *in vitro*-Tests konnte gezeigt werden, dass sich das Polymer negativ auf die Stummschaltungseffizienz der Partikel auswirkt. Dieser Effekt war bei den CaP-PEI-siRNA-SiO₂-SH-Partikeln stärker ausgeprägt als bei den CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikeln. Schon bei geringen Konzentrationen an Eudragit® ließen sich die Partikel umladen. In der Folge war die Aufnahme der Partikel inhibiert.

Alternativ wurde ein Zäpfchen zur rektalen Vergabe der Partikel entwickelt. Hierbei konnten die Partikel in *adepts solidus* dispergiert werden. Auch durch das Zäpfchen wurde die Effizienz der Partikel gemindert. Jedoch war der Stummschaltungseffekt der aus dem Fett freigesetzten Partikel bei beiden Partikelsorten wesentlich höher als bei den aus der Kapsel freigesetzten Partikeln.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Calciumphosphat-Nanopartikel synthetisiert und mit unterschiedlichen Nukleinsäuren funktionalisiert. Die Nanopartikel dienten dabei als Transportvehikel, um die Nukleinsäure ins Innere von Zellen zu schleusen.

Zunächst wurde die Transfizierbarkeit von neun Zelllinien und hMSC untersucht. Die Zellen sollten dafür mit dem grün fluoreszierenden Protein eGFP transfiziert werden, sodass eine erfolgreiche Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskop detektierbar war. Die Transfektionseffizienz der Nanopartikel wurde dabei mit der Transfektionseffizienz des kommerziell erhältlichen Transfektionsagens Lipofectamine® 2000 verglichen. Zwar konnten die Zellen mit Lipofectamine® 2000 am effizientesten transfiziert werden, jedoch lieferten die Nanopartikel ähnlich gute Transfektionseffizienzen. Damit stellten die Nanopartikel *in vitro* ein potentes Transfektionsagens dar. Einige Zellen waren dabei gut transfizierbar, während andere Zelltypen nur schlecht oder gar nicht transfiziert wurden. Die Zellen, die gut transfiziert wurden, waren auch diejenigen Zelllinien, die sich schnell teilten. Weiterhin stellte sich heraus, dass gut transfizierte Zellen unabhängig vom Transfektionsagens auch mit einer erhöhten Toxizität auf die Transfektionsagenzien reagierten. So konnte eine Korrelation zwischen Transfektionseffizienz und Toxizität gefunden werden, die auf einen gemeinsamen Parameter hindeutete. In der Literatur gibt es ähnliche Hinweise, die hier in einer breit angelegten Studie mit vielen unterschiedlichen Zelltypen gezeigt werden konnten. Der Parameter, der sowohl Transfektionseffizienz als auch Toxizität verbindet, ist, falls existent, bisher noch unbekannt.

Anschließend wurde die Transfektion von zwei Zelllinien mittels FACS und qPCR untersucht. Obwohl es sich dabei um andere Zellpassagen und eine andere Partikelcharge handelte, ließen sich die Ergebnisse gut reproduzieren. Die Transfektion konnte so auf Proteinebene und mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Im Anschluss wurden die Partikel *in vivo* zur Transfektion von Zellen im Darm von BALB/c-Mäusen eingesetzt. Dazu wurde eine Dispersion der Nanopartikel rektal appliziert. Es zeigte sich, dass eine Transfektion mittels Nanopartikel durchaus möglich war. Die Epithelzellen exprimierten eGFP innerhalb der ersten

beiden Tage nach der Transfektion. Außerdem konnte die Expression mittels FACS und qPCR nachgewiesen werden. Die Transfektionseffizienz war *in vivo* deutlich geringer als *in vitro*, jedoch waren Nanopartikel hier etwas besser als Lipofectamine® 2000.

Im anschließenden Kapitel wurde die Stummschaltung von entzündungsrelevanten Genen mittels Calciumphosphat-Nanopartikeln untersucht. Dazu wurden fünf verschiedene auf Calciumphosphat-basierende Nanopartikelsorten mit siRNA funktionalisiert. Zunächst wurde die Stummschaltung von eGFP in HeLa-eGFP-Zellen mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen, FACS und qPCR untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die mittels FACS und qPCR erhaltenen Ergebnisse weitestgehend miteinander korrelierten. Die durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erhaltenen Ergebnisse hingegen wichen ab. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass im Mikroskop nur Zellen, die gar kein Protein mehr exprimierten, als stummgeschaltet identifiziert werden konnten. FACS und qPCR hingegen konnten die Expression des Proteins genauer erfassen.

Die erhaltenen Ergebnisse sollten auf die Stummschaltung des entzündungsrelevanten Proteins TNF- α übertragen werden. Hierzu wurden Mode-K-Zellen zunächst stimuliert, sodass sie verstärkt TNF- α exprimierten. Es stellte sich heraus, dass einige Partikelsorten eGFP stark herunterregulieren konnten, TNF- α allerdings nicht. Partikel des schematischen Aufbaus CaP-siRNA-CaP-PEI und CaP-siRNA-PLGA-PEI waren in beiden Fällen in der Lage, die Expression der Proteine zu verhindern. CaP-siRNA-CaP-PEI-Partikel konnten TNF- α ähnlich effizient herunterregulieren wie Lipofectamine® 2000. Somit ist die Effizienz auch ähnlich stark wie bei anderen in der Literatur bekannten Systemen, die ebenfalls mit Lipofectamine® 2000 verglichen wurden.

Da die Verkapselungseffizienz von siRNA in CaP-siRNA-PLGA-PEI-Partikel am höchsten war, wurde dieses System zur therapeutischen Stummschaltung von entzündungsrelevanten Proteinen im DSS-*Colitis*-Mausmodell eingesetzt. In diesem Modell konnte das therapeutische Potential dieser Partikel zur Behandlung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt werden. Somit führte die Herunterregulierung der entzündungsrelevanten Gene mittels siRNA auch zu einer Verbesserung im Krankheitsbild der Mäuse.

Im letzten Teil der Arbeit wurden Strategien zum Transport der Nanopartikel in den Darm entwickelt. Sollen die Nanopartikel über eine orale Aufnahme in den Darm gelangen, so müssen sie vor der Magensäure geschützt werden. Dazu wurden gefriergetrocknete Nanopartikel in eine Gelatine kapsel gefüllt und mit dem magensaftresistenten Polymer Eudragit® L 100 überzogen. Die Polymerschicht schützte die Nanopartikel zwar vor dem Abbau in der Magensäure, jedoch interagiert das Polymer nach Auflösung bei neutralen pH-Werten mit den positiv geladenen Nanopartikeln, sodass diese in der Zellkultur nicht mehr funktionell waren.

Alternativ konnte ein Zäpfchen entwickelt werden, das die Nanopartikel nach rektaler Applikation im Darm freisetzen würde. In *in vitro* Versuchen stellte sich heraus, dass die Partikel nach Freisetzung aus einem Zäpfchen etwas schlechtere Stummschaltungseffizienzen aufwiesen als Nanopartikel, die als Dispersion eingesetzt wurden. Dennoch blieben hohe Stummschaltungseffizienzen erhalten.

5 Material und Methoden

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den theoretischen Hintergründen der Materialien und Methoden, die für die Experimente verwendet wurden, und spezifiziert die verwendeten Geräte. Desweiteren wird beschrieben, welche Informationen mit den jeweiligen Geräten erzeugt werden sollten. Das Kapitel wurde in 5.1 Kolloidchemische Methoden und 5.2 Zellbiologische Analysemethoden unterteilt.

5.1 Kolloidchemische Methoden

In diesem Abschnitt werden die Techniken beschrieben, die zur Charakterisierung und Konservierung der hergestellten Dispersionen dienen. Im Fokus lagen dabei die Partikelgrößenverteilung, die Partikelladung, die Konzentration an Partikeln, die Konzentration an Nukleinsäure. Zur Konservierung der kolloidalen Dispersionen wurden die Partikel in Gegenwart von geeigneten Kryoprotektoren gefriergetrocknet.

5.1.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotenzial

Dynamische Lichtstreuung kann zur Charakterisierung von kolloidalen Dispersionen verwendet werden. Dabei können Aussagen über die durchschnittliche Partikelgrößenverteilung, die Polydispersität und die kolloidale Stabilität der Dispersion getroffen werden. Wird außerdem das Zetapotenzial bestimmt, so können auch Aussagen über die Eigenschaften der Oberfläche der Partikel und deren Ladung getroffen werden.

Trifft elektromagnetische Strahlung auf Materie, so kann sie unter anderem gestreut werden. Neben dem Streulicht nutzt die dynamische Lichtstreuung aus, dass sich die Position kolloidaler Partikel aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung ständig verändert. Zur Ermittlung der Größenverteilung von Partikeln in einer kolloidalen Dispersion durch DLS wird monochromatisches Licht eines Lasers in die Probe gestrahlt. Die Intensität des gestreuten Lichtes wird von einem Detektor in einem bestimmten Winkel gemessen. Da sich sehr viele Partikel in dem bestrahlten Volumen befinden, die alle das einfallende Licht streuen, kommt es zu konstruktiver und destruktiver Interferenz. Durch die Interferenzen kommt es zu räumlichen Fluktuationen der Streulichtintensität, die auf dem Detektor als helle und dunkle Punkte wahrgenommen werden.^{20, 96, 189} Desweiteren kommt es aufgrund der Bewegung der Partikel zu zeitlichen Fluktuationen der Streulichtintensität. Dies ist die eigentliche Messgröße bei der DLS. So nimmt die Korrelation des Streulichts in Abhängigkeit von der Zeit ab. Dies wird durch die Autokorrelationsfunktion beschrieben. Bewegen sich die Partikel schneller, so nimmt auch die Korrelation der Streulichtintensität schneller ab. Typischerweise betragen die DLS-Messintervalle Mikro- bis Nanosekunden. Mittels der Autokorrelationsfunktion kann der Diffusionskoeffizient berechnet

werden. Der Diffusionskoeffizient hängt wiederum über die *Stokes-Einstein-Gleichung* mit dem hydrodynamischen Durchmesser der Partikel zusammen^{20, 96, 190}:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (5)$$

Dabei sind D der Diffusionskoeffizient, k die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, η die Viskosität und R_h der hydrodynamische Radius. Streng genommen gilt dieser Zusammenhang jedoch nur für kugelförmige Partikel.

Da oftmals verschiedene Partikelgrößen in einer Dispersion vorliegen (Polydispersität), sind geeignete Algorithmen notwendig, um die Partikelgrößenverteilung aus der Autokorrelationsfunktion zu erhalten. Am weitesten verbreitet ist dabei die Kumulanten-Methode. Die in dieser Arbeit angegebenen Größen nach DLS beziehen sich immer auf den *z-average*, der die mittlere Größe der Partikel angibt.²⁰

DLS-Messungen bieten viele Vorteile. So ist die Messung sehr schnell und es wird die Größe der Partikel in Dispersion gemessen. Desweiteren werden im Vergleich zu mikroskopischen Methoden sehr viele Partikel im Ergebnis berücksichtigt. Auf der anderen Seite sind die Daten aus DLS-Messungen jedoch schwierig zu interpretieren. So streuen große Partikel das Licht mit einer sehr viel höheren Intensität als kleine. Unter der Annahme von *Rayleigh*-Streuung, die für sehr kleine Partikel gilt ($d < \lambda/20$; λ =Wellenlänge des eingestrahlt Lichts), ist die Streulichtintensität $I \sim d^6$.¹⁹⁰ Dieser Zusammenhang verdeutlicht, dass große Partikel die Partikelgrößenverteilung sehr viel stärker beeinflussen als kleine.

Rückschlüsse auf die Polydispersität einer Probe gewährt der PDI (*polydispersity index*). Dieser Wert ergibt sich aus der Breite der Partikelgrößenverteilung. Da der Wert zeigt, ob sich die Größen verschiedener Partikel innerhalb einer Probe stark unterscheiden, erlaubt er auch eine Bewertung des Messergebnisses. So sind durch DLS bestimmte Größenverteilungen nur dann mit Größenverteilungen aus anderen Methoden vergleichbar, wenn der PDI $< 0,1$ ist. Für PDI zwischen 0,1 und 0,5 sind Größenverteilungen von Dispersionen, die mittels DLS bestimmt wurden, miteinander vergleichbar.²⁰

Einerseits lässt sich über die Streuung von Licht an Partikeln auf deren Größe schließen. Andererseits kann die Streuung von geladenen Partikeln, die sich in einem angelegten elektrischen Feld bewegen, dazu genutzt werden, die Geschwindigkeit der Partikel zu bestimmen. Dies geschieht über die sogenannte LDV Technik (*laser doppler velocimetry*). Die Geschwindigkeit der Partikel erlaubt Rückschlüsse auf ihre elektrophoretische Mobilität. Diese ist wiederum über die Henry-Gleichung mit ihrem Zetapotenzial verknüpft:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(Ka)}{3\eta} \quad (6)$$

Dabei ist U_E die elektrophoretische Mobilität, ε bezeichnet die Dielektrizitätskonstante, η ist die Viskosität, $f(Ka)$ ist die Henry-Funktion und z ist das Zetapotenzial.

Zur Messung der Partikelgrößenverteilung von kolloidalen Dispersionen wurde in dieser Arbeit ein Nano ZS Zetasizer von Malvern verwendet. Neben der Partikelgrößenverteilung kann dieses Gerät auch das Zetapotenzial messen. Zur Auswertung wurde die „Zetasizer Software“ (7.11) von Malvern verwendet.

5.1.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Neben der DLS kann auch die Rasterelektronenmikroskopie (REM) der Bestimmung der Größe von Partikeln dienen. Im Gegensatz zur DLS müssen die Proben jedoch vorher getrocknet werden, sodass die Partikel nicht in Dispersion vermessen werden können. Vorteilhaft ist, dass das Ergebnis nun nicht durch wenige große Partikel überproportional beeinflusst wird. Kommt es in Dispersion zu Agglomeration, können durch das Rasterelektronenmikroskop weiterhin die primären Partikel beobachtet werden. Außerdem ist es möglich die Morphologie, der Partikel zu beschreiben. Dies sind nur einige Informationen, die leicht mittels Rasterelektronenmikroskopie über eine Probe erhalten werden. Neben der Tatsache, dass Partikel nicht in Dispersion untersucht werden können, ist jedoch ein weiterer Nachteil, dass immer nur ein kleiner Ausschnitt einer Probe untersucht werden kann.

Die maximale Auflösung von Mikroskopen wird durch die Wellenlänge begrenzt (Abbe-Limit). Abhängig von der Energie des Elektronenstrahls kann die Wellenlänge bis zu 100000x kleiner sein als die Wellenlänge von sichtbarem Licht. So erreichen kommerzielle Elektronenmikroskope Auflösungen von etwa 2-5 nm und eignen sich daher zur Untersuchung von Nanomaterialien.¹⁹¹⁻¹⁹³

Zunächst ist zur Elektronenmikroskopie ein Elektronenstrahl nötig. Dieser wird an der Elektronenkanone erzeugt, und Elektronen mit einer Energie von 1 keV bis 40 keV werden produziert. Elektronenstrahlen können unter anderem mit Wolframdrähten oder LaB₆-Kristallen (Lanthanhexaboridkristalle) erzeugt werden. Über magnetische Linsen kann der Elektronenstrahl im nächsten Schritt fokussiert werden. Nach der Fokussierung des Elektronenstrahls kann dieser in einem bestimmten Raster über die Probe geleitet werden, wodurch mithilfe eines Detektors ein Bild generiert werden kann.

Die Elektronen können auf verschiedene Weisen mit der angestrahlten Materie interagieren, wodurch unterschiedliche Signale erzeugt werden, die von Detektoren detektiert werden. Einerseits können Elektronen detektiert werden, deren Energie in etwa der des Elektronenstrahls entspricht. Diese Elektronen werden als BSE (*back scattered electrons*) bezeichnet und entstehen durch Rutherford-Streuung nahe des Atomkerns. Andererseits können Elektronen mit niedrigerer Energie als der des Elektronenstrahls detektiert werden. Diese resultieren aus der Interaktion des Elektronenstrahls mit der Elektronenhülle der Atome der Probe. Dazu zählen unter anderem SE (*secondary electrons*).¹⁹² Während BSE auch dann detektiert werden können, wenn sie etwas tiefer in der Probe gestreut werden, so können SE nur dann detektiert werden, wenn sie in der Nähe der Oberfläche entstehen.

Um die Interaktion des Elektronenstrahls mit Atomen eines Gases zu verhindern, wird REM unter Vakuum-Bedingungen durchgeführt. Weiterhin würde die Bestrahlung von nicht-leitenden Proben mit dem Elektronenstrahl zur Aufladung der Probe führen. Um dies zu verhindern, kann die Probe mit einer sehr dünnen Schicht (10 nm bis 20 nm) eines Edelmetalls beschichtet werden. Dieser Prozess wird als *sputtering* bezeichnet. In dieser Arbeit wurde für alle Proben Gold-Palladium (80:20) verwendet. Die Bilder aus dieser Arbeit wurden mit einem ESEM Quanta 400 von FEI aufgenommen. Die Partikeldispersionen wurden nach der Synthese auf einen Aluminiumträger getropft und bei 37 °C getrocknet. Für

CaP-Nukleinsäure-PLGA-PEI-Partikel wurde ein Siliziumwafer mittels eines selbstklebenden Kohlepads auf dem Aluminiumträger fixiert. Die Nanopartikeldispersion wurde auf das Silizium getropft und bei Raumtemperatur getrocknet.

5.1.3 UV/Vis-Spektrometrie

Die UV/Vis-Spektrometrie ermöglicht es, die Konzentration von Molekülen in Lösungen zu bestimmen. Eine Voraussetzung dafür ist, dass das Molekül Licht im UV- bis Vis-Bereich absorbiert. In dieser Arbeit wurde die Konzentration an Nukleinsäuren bestimmt, um deren Konzentration in den kolloidalen Dispersionen zu erhalten.

Die Intensität eines Lichtstrahls, der durch eine Probe geleitet wird, kann durch Absorption, Streuung oder Reflexion verringert werden. Bei der Messung werden die Beiträge von Streuung und Reflexion durch Messung einer Blindprobe bestimmt. Die Intensitätsabnahme eines Lichtstrahls ist dann auf die Absorption durch gelöste Moleküle zurückzuführen. Abhängig von ihrer elektronischen Struktur absorbieren in der Probe gelöste Moleküle Licht in bestimmten Wellenlängen. Die Konzentration der gelösten Moleküle hängt für verdünnte Lösungen über das *Lambert-Beer-Gesetz* mit der Absorption zusammen¹⁹⁴⁻¹⁹⁶:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c d \quad (7)$$

Dabei ist A die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge, ϵ ist der molare Absorptionskoeffizient und d ist die Dicke der Schicht durch die der Lichtstrahl dringt. Der molare Absorptionskoeffizient ist eine stoffspezifische Größe, die beispielsweise mit einer Eichgeraden bestimmt werden kann. Für DNA lassen sich Konzentrationen in einem Bereich von $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ gut nachweisen.

Die Basen von Nukleinsäuren haben bei einer Wellenlänge von 260 nm typischerweise ein Absorptionsmaximum. Zur Berechnung der Konzentration an Nukleinsäuren gibt es OD1-Werte. Dieser Wert gibt die Konzentration an Nukleinsäure an, die vorliegt, wenn die Absorption bei 260 nm 1 ist. Für die verwendeten Nukleinsäuren sind die OD1-Werte, die als Grundlage zur

Berechnung der Nukleinsäurekonzentration benutzt wurden, in Abschnitt 6.1 angegeben.

Die Absorption einer reinen Nukleinsäurelösung sollte bei einer Wellenlänge von 320 nm null sein. War dies nicht der Fall wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 320 nm von der Absorption bei 260 nm substrahiert.¹⁹⁵

Für diese Arbeit wurde ein Cary Bio 300 Spektrophotometer von *Varian* verwendet. Alle Messungen wurden in einer Quartzküvette mit einer Schichtdicke $d=1$ cm durchgeführt.

5.1.4 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) kann dazu genutzt werden, die Konzentration bestimmter Elemente in einer Probe zu erhalten. Freie Atome absorbieren dabei das für sie spezifische Licht. In dieser Arbeit wurde die AAS dazu verwendet den Calciumgehalt in kolloidalen Dispersionen zu bestimmen. Daraus konnte die Anzahl an Partikeln pro Milliliter, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben wurde, berechnet werden.

Zur Atomabsorptionsspektrometrie muss die zu untersuchende Probe atomisiert werden, sodass das zu untersuchende Element als Gas vorliegt. Diese Atomisierung kann im einfachsten Falle mit einer Flamme erreicht werden. Anschließend kann die Absorption von monochromatischem Licht spezifischer Wellenlänge gemessen werden. Die Konzentration des gewünschten Elements kann dann mittels des *Lambert-Beer'schen* Gesetzes (Formel 7) berechnet werden.¹⁹⁷

Die Nachweisgrenze für Calcium liegt in der Atomabsorptionsspektrometrie bei $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. In dieser Arbeit wurden die Calciumbestimmungen mit einem Atomabsorptionsspektrometer der M-Serie von *Thermo Electron* durchgeführt. Vor den Messungen wurden die Calciumphosphat Nanopartikel in Säure gelöst. Die Analysen wurden im Labor für Mikroanalytik des AK Eppe durchgeführt.

5.1.5 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung wird auch als Lyophilisation bezeichnet und ist ein schonendes Verfahren zur Trocknung von wässrigen Lösungen und Dispersionen. In dieser Arbeit wurde die Gefriertrocknung dazu verwendet die Stabilität und Lagerfähigkeit der kolloidalen Dispersionen zu erhöhen. Desweiteren wurden gefriergetrocknete Nanopartikel zur Beladung von Kapseln

und Zäpfchen verwendet, die die Wirkstoffe im Körper zu den notwendigen Geweben transportieren sollten.

Die Lyophilisation beruht auf der Sublimation und Resublimation von Wasser. Dies bezeichnet die direkten Phasenübergänge vom festen Aggregatzustand in den gasförmigen und andersherum. Die Bedingungen, unter denen Wasser sublimiert und resublimiert, sind im Phasendiagramm von Wasser ablesbar. So finden diese Phasenübergänge nur bei Drücken unter 6 mbar und Temperaturen unter 0 °C statt. Bei der Gefriertrocknung wird nun das Wasser aus der Probe sublimiert und an einem Kondensator bei niedrigerer Temperatur wieder resublimiert.

Der Zusatz von geeigneten Kryoprotektoren vor dem Einfrieren, wie beispielsweise Trehalose, kann die Probe vor Stress während des Gefrierens und Trocknens schützen. Der Schutz beruht üblicherweise auf der Immobilisierung einer Substanz durch Ausbildung einer Matrix durch den Kryoprotektor.¹⁷⁹

In dieser Arbeit wurde ein Alpha 2 – 4 LSC Gefriertrockner von Martin Christ verwendet. Proben wurden zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Wasser bei 0,32 mbar und -10 °C sublimiert. Der Kondensator hatte eine Temperatur von -85 °C. CaP-siRNA-PLGA-Partikel wurden ohne Zusatz von Trehalose getrocknet, bei allen anderen Dispersionen wurde 10 mg mL⁻¹ Trehalose als Kryoprotektor verwendet.

5.2 Zellbiologische Analysemethoden

Dieser Abschnitt beschreibt die wichtigsten Methoden, die zur Analyse von Zellkulturversuchen und *in vivo* Experimenten angewendet wurden. Maßgeblich wurden die Effekte und Interaktionen von Nanopartikeln mit Zellen und Geweben untersucht. Neben den hier beschriebenen Methoden wurden weitere Techniken, wie beispielsweise Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, verwendet.

5.2.1 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*), die auch als *real-time* PCR bezeichnet wird, dient der Quantifizierung spezifischer Nukleinsäuren. Somit kann die zelluläre Expression bestimmter Proteine auf mRNA-Ebene quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener Proteine nach Transfektions- oder Stummschaltungsexperimenten sowohl in *in vitro* als auch *in vivo* mittels qPCR untersucht.

Die qPCR geht als Weiterentwicklung aus der Polymerasekettenreaktion (PCR) hervor. Mittels spezifischer Primer ist es möglich bestimmte DNA Sequenzen mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase zu vervielfältigen.¹⁹⁸ Die Vervielfältigung läuft dabei in den drei Phasen Denaturierung, *annealing* und *elongation* ab. Bei der qPCR wird anders als bei der PCR nach jeder *elongation*-Phase die Menge an Produkt über geeignete Fluoreszenzfarbstoffe quantifiziert. So können einige Farbstoffe nach Interaktion mit doppelsträngiger DNA ihre Emmissionseigenschaften verändern und so über Fluoreszenzmessungen Aufschluss über die Menge der gewünschten DNA geben.¹⁹⁹ Mit jedem PCR-Zyklus sollte die Fluoreszenzintensität also steigen. Wird das Fluoreszenzsignal einer Probe gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen, so wird für jede Probe eine sigmoidale Kurve erhalten. Es kann nun ein Fluoreszenzschwellenwert innerhalb des exponentiell ansteigenden Teils der Kurve gesetzt werden. Je später die Kurve diesen Wert überschreitet, desto weniger der untersuchten DNA war in der Probe. Der zugehörige x-Wert wird als C_t -Wert bezeichnet und wird als Grundlage zur Berechnung der ursprünglichen DNA-Menge verwendet. So kann die Menge an DNA sowohl absolut als auch relativ quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurden relative Expressionslevel

angegeben. Dafür wurde die Menge an DNA des zu untersuchenden Gens auf die Menge der DNA eines sogenannten *housekeeping*-Gens normalisiert. Das *housekeeping*-Gen wird von den Zellen unabhängig von der Behandlung exprimiert. Durch Normierung mit diesem Gen ist die relative Expression des Zielgens unabhängig von der Anzahl der untersuchten Zellen.

Außerdem ist eine Kalibrierungsprobe notwendig. In dieser Arbeit wurden dazu jeweils gleiche Anteile jeder Probe gemischt. Desweiteren wurde anhand einer Standardkurve die Effizienz der Amplifizierung beider Gene untersucht. Dazu wurde die Kalibration in verschiedenen Verdünnungen gemessen. Eine Auftragung der C_t -Werte der Standardkurve gegen den Logarithmus der Verdünnung ergibt eine Gerade aus deren Steigung die Amplifizierungseffizienz berechnet werden kann. Der Quotient aus der Amplifizierungseffizienz der untersuchten DNA und der DNA des *housekeeping*-Gens lässt nach Formel (8) auf die relative Expression der untersuchten DNA schließen²⁰⁰:

$$\text{relative Expression} = \frac{(E_{\text{Ziel-DNA}})^{(C_t(\text{Kalibration}) - C_t(\text{Probe}))}}{(E_{\text{housekeeping-DNA}})^{(C_t(\text{Kalibration}) - C_t(\text{Probe}))}} \quad (8)$$

Dabei bezeichnet E jeweils die Effizienz der Amplifizierung. Zähler und Nenner aus Formel (8) wurden von der Software ausgegeben („Quantity“).

Anschließend kann dann die relative Expression der Ziel-DNA von Kontrollen mit der relativen Expression der Ziel-DNA der Experimente verglichen werden.

Wie eingangs erwähnt wurde, wird die Expression der Proteine auf mRNA-Ebene untersucht. Damit die mRNA mittels qPCR quantifiziert werden kann, muss sie daher mittels reverser Transkriptase zunächst in cDNA (*complementary DNA*) transkribiert werden.

Die qPCR wurde am Institut für medizinische Mikrobiologie am Uniklinikum Essen in der Gruppe von Prof. Dr. Astrid Westendorf durchgeführt. Es wurden ein *7500 Fast Real-Time System* (Applied Biosystems, *Life technologies*) und die *7500 Fast Real-Time System Software* zur Auswertung verwendet.

5.2.2 Durchflusszytometrie (FACS – *fluorescence assisted cell sorting*)

In dieser Arbeit werden die Begriffe Durchflusszytometrie und FACS synonym verwendet. So dient die Durchflusszytometrie in erster Linie der

Charakterisierung verschiedener Zellen anhand von Streulicht und Fluoreszenzsignalen. Das FACS kann die Zellen anhand dieser Signale auch sortieren.

Mittels FACS lassen sich große Anzahlen an Zellen schnell und individuell untersuchen. Mittels Streulicht können verschiedene Zelltypen voneinander unterschieden werden. Weiterhin können Fluoreszenzsignale der Zellen, zum Beispiel von eGFP, ausgewertet werden. In dieser Arbeit wurde das FACS zur Analyse der Expression an eGFP ausgenutzt. So wurde die Expression in HeLa-eGFP-Zellen nach der Stummschaltung von eGFP untersucht. Andererseits wurde die Expression von eGFP in verschiedenen Zelllinien nach der Transfektion analysiert.

Die Funktionsweise eines FACS ist in **Abbildung 55** schematisch dargestellt.

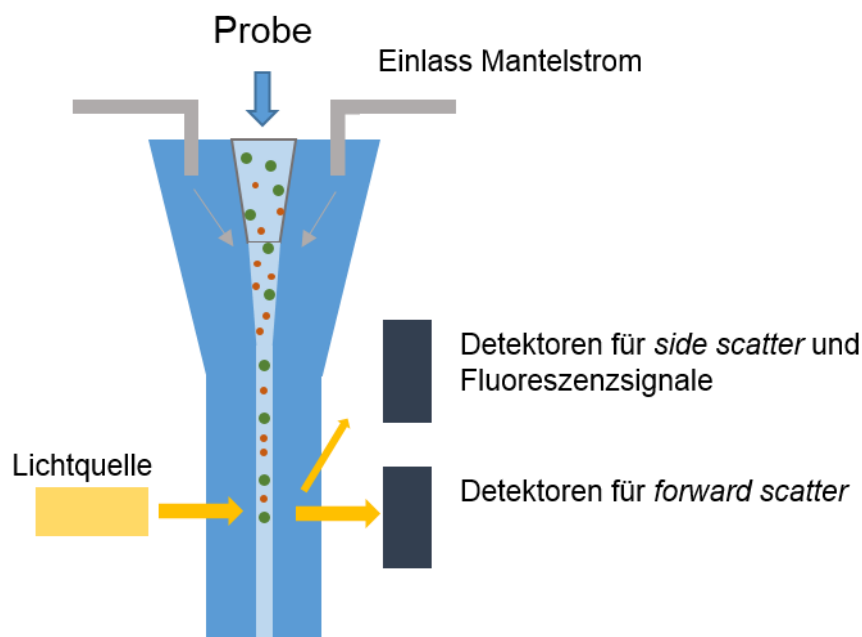


Abbildung 55: schematische Darstellung der Funktionsweise des FACS. Eine Probe wird über den Einlass in das Gerät gegeben. Die Probe wird hydrodynamisch fokussiert, sodass die Zellen einzeln auf den Laserstrahl treffen. (Nachgezeichnet aus Quelle²⁰¹)

Beim FACS wird die Probe zunächst durch den Mantelstrom hydrodynamisch fokussiert, wodurch ein Probenstrom mit einem Durchmesser von ca. 10 µm entsteht. Zur Analyse der Zellen dient typischerweise ein Laser als Lichtquelle, der die Zellen einzeln anstrahlt.

Das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*) wird von Detektoren in einem Winkel von etwa 0,5° bis 10° detektiert. Das Seitwärtstreulicht (*side scatter*) und

Fluoreszenzsignale werden in ca. 90° zum Anregungslaserstrahl detektiert. Während das Vorwärtstreulicht größtenteils von der Größe der Zellen abhängt, kann das Seitwärtstreulicht Aufschluss über die Granularität der Zellen geben. Somit können verschiedene Zellpopulationen innerhalb einer Probe voneinander unterschieden werden. Die Fluoreszenzdetektoren können zusätzlich fluoreszierend markierte Zellen oder fluoreszierende Bestandteile von Zellen detektieren.²⁰¹ So können beispielsweise geeignete Farbstoffe zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen dienen.

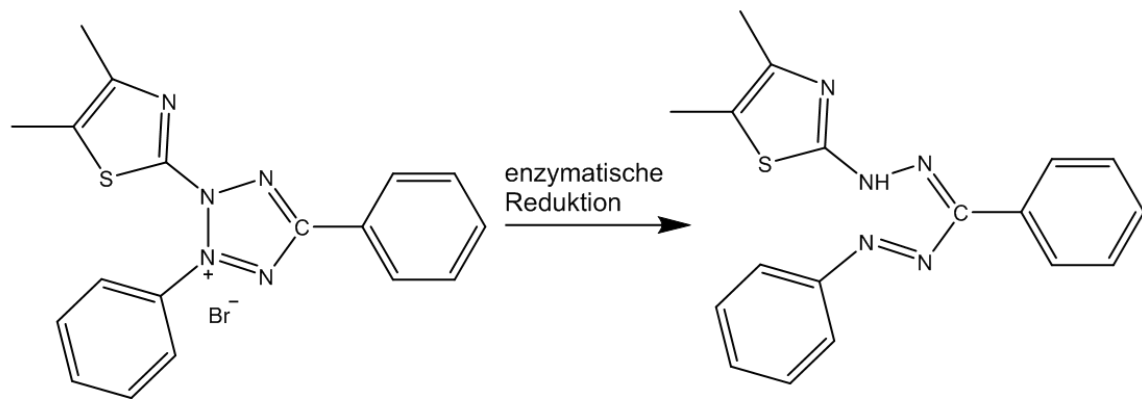
Die FACS-Messungen wurden am Institut für medizinische Mikrobiologie am Uniklinikum Essen in der Gruppe von Prof. Dr. Astrid Westendorf durchgeführt. In dieser Arbeit wurden FACS LSR II und FACS Aria II von BD (Heidelberg) verwendet.

5.2.3 MTT-Test

Der MTT-Test bietet die Möglichkeit die Zytotoxizität von Substanzen schnell zu erfassen. Über ein kolorimetrisches Verfahren ist die Proliferation von unbehandelten Kontrollzellen mit der Proliferation von mit einer Substanz behandelten Zellen vergleichbar. In dieser Arbeit wurde der MTT-Test verwendet, um die zytotoxischen Eigenschaften der Nanopartikel zu untersuchen.

Zunächst werden die Zellen mit dem wasserlöslichen Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) inkubiert. Dieser wird von lebenden Zellen intrazellulär, enzymatisch zum wasserunlöslichen Formazan ((E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan) reduziert. Dabei ändert der Farbstoff seine Farbe von gelb zu blau. Aufgrund der Löslichkeit des Formazan akkumuliert sich der blaue Farbstoff außerdem in den lebenden Zellen. Anschließend kann das Formazan in DMSO gelöst werden und photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm untersucht werden. Die Absorption des Farbstoffes ist dabei proportional zur Anzahl der Zellen.²⁰²

Abbildung 56 zeigt die Umsetzung des Farbstoffes.



3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)

(E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan (Formazan)

Abbildung 56: Der wasserlösliche, gelbe Farbstoff MTT wird intrazellulär, enzymatisch zum wasserunlöslichen Formazan reduziert.

Die Reduktion des MTT findet dabei in den Mitochondrien mittels Succinat-Dehydrogenase statt. Im Zytosol wird MTT durch NADH- und NADPH-abhängige Enzyme reduziert.²⁰³

6. Experimenteller Teil

6.1 Synthese und Charakterisierung der Nanopartikel

Alle Nanopartikelsorten wurden mit verschiedenen Nukleinsäuren funktionalisiert. Wurden Nanopartikel zur Transfektion von Zellen mit eGFP eingesetzt, so wurden sie mit dem Plasmid pcDNA3-eGFP funktionalisiert. Das Plasmid (pDNA) konnte in *e.coli* Bakterien hergestellt werden. Die pDNA konnte mittels eines NucleoBond® PC10000 EF *endotoxin-free plasmid purification* Kits von Machery-Nagel aufgereinigt werden. Das Plasmid bestand aus etwa 5441 Basenpaaren³⁸ und hatte eine molare Masse von etwa $M(\text{pcDNA3-eGFP})=3621600 \text{ g mol}^{-1}$.⁴⁶ Bei der Bestimmung der Konzentration des Plasmids wurde ein Umrechnungsfaktor bei 260 nm $\text{OD1}=50 \mu\text{g mL}^{-1}$ angenommen.

Zur Herstellung fluoreszierender Nanopartikel wurde unter anderem ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid verwendet. Dabei handelte es sich um ein mit dem Farbstoff AlexaFluor® 647 funktionalisiertes Oligonukleotid (Oligo647). Die Sequenz des Oligonukleotids lautete:

5'-AlexaFluor647-TTAGCCATGGGTGCACTTGAGCTGC

Die molare Masse des Oligonukleotids war $M(\text{Oligo647})=8703,2 \text{ g mol}^{-1}$. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes lag bei 650 nm. Zur Bestimmung der Konzentration des Oligonukleotids mittels UV/Vis-Spektrometrie wurde eine Kalibrationsgerade angefertigt.

Weiterhin wurden verschiedene siRNAs mit folgenden molaren Massen und Umrechnungsfaktoren verwendet. Die Umrechnungsfaktoren zur Bestimmung der Konzentration mittels UV/Vis-Spektrometrie wurden vom jeweiligen Hersteller angegeben. Die siRNAs wurden von verschiedenen Herstellern bezogen. So enthalten die siRNAs TNF- α , IP-10 und KC unbekannte chemische Modifikationen (*on-targetplus*), die deren Spezifität und Effizienz erhöhen sollen:

siRNA-eGFP (lifetechnologies):

sense: 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU

antisense: 5'-AUGAACUUCAGGGUCAGCUUGC

$M(\text{siRNA-eGFP})=14019,8 \text{ g mol}^{-1}$; $\text{OD1}=40 \mu\text{g mL}^{-1}$

siRNA-TNF- α (*on-targetplus*, GE Dharmacon):

target sequence: GCCGAUGGGUUGUACCUUG

$M(\text{siRNA-TNF-}\alpha) = 13459,9 \text{ g mol}^{-1}$; $OD1 = 37,3 \mu\text{g mL}^{-1}$

siRNA-IP10 (*on-targetplus*, GE Dharmacon):

target sequence: GAAUGAGGGCCAUAGGGAA

$M(\text{siRNA-IP10}) = 13444,8 \text{ g mol}^{-1}$; $OD1 = 36,7 \mu\text{g mL}^{-1}$

siRNA-KC (*on-targetplus*, GE Dharmacon):

target sequence: GACCAUGGCUGGGAUUCAC

$M(\text{siRNA-KC}) = 13459,8 \text{ g mol}^{-1}$; $OD1 = 37,4 \mu\text{g mL}^{-1}$

siRNA-scramble (*on-targetplus*, GE Dharmacon):

target sequence: UGGUUUACAUGUUGUGUGA

$M(\text{siRNA-scramble}) = \text{unbekannt}$; $OD1 = 40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (angenommen)

6.1.1 Synthese der CaP-Nukleinsäure-CaP-PEI-Partikel

Nanopartikel des schematischen Aufbaus CaP-Nukleinsäure-CaP-PEI wurden mit jeweils einer der Nukleinsäuren DNA, siRNA oder Oligo647 funktionalisiert. Die Synthese war bei allen Nukleinsäuren gleich und lehnte sich an die Synthesen aus Quelle³⁸ an. Wurden die Partikel mit siRNA funktionalisiert, wurde (bei allen Partikelsorten) so steril wie möglich gearbeitet. In wässrigen Lösungen wurden RNasen, falls möglich, durch Behandlung mit DEPC inaktiviert.²⁰⁴ Die Synthese wurde unter einer Sterilbank durchgeführt.

Gleiche Volumina einer Ca-L-Lactat Lösung (6,25 mM, pH 9, 217 μL) und einer Diammoniumhydrogenphosphatlösung (3,74 mM, pH 9, 217 μL) wurden zur gleichen Zeit mit einer Spritzenpumpe in eine Nukleinsäurelösung (1 mg mL^{-1} , 87 μL) in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß gepumpt. Die Calciumlösung und die Phosphatlösung wurden über ein y-Stück in die Nukleinsäurelösung gepumpt. Die Nukleationszeit zur Bildung von Calciumphosphat innerhalb des y-Stückes betrug dabei 0,25 s. Die Stabilisierung der Nanopartikel wurde über die Funktionalisierung mit Nukleinsäuren gewährleistet. Sofort nach Zugabe der Calcium- und Phosphatlösung zur Nukleinsäurelösung wurde gevortext bevor

eine Aufreinigung durch Zentrifugation (15 min, 14800 rpm) stattfand. Der Überstand wurde zur Analyse mittels UV/Vis-Spektrometrie verwendet. Die Nanopartikel im Pellet wurden im gleichen Volumen (521 μL) Wasser mittels Ultraschallsonotrode (MS2, Puls 0,8, Amplitude 80 %, 10 s) redispergiert.

Im nächsten Schritt wurden mittels Eppendorfpipette nochmals je 217 μL der Calcium-L-Lactatlösung und der Diammoniumhydrogenphosphatlösung zu der kolloidalen Dispersion hinzugegeben, umgehend gefolgt von 45 μL einer wässrigen PEI-Lösung (2 mg mL^{-1}). Dies sollte die Nukleinsäuren durch Bildung einer weiteren Calciumphosphathülle schützen. Die Zugabe von PEI sorgte für kolloidale Stabilisierung und ein positives Zetapotenzial. Zur Entfernung freier Ionen und freien PEIs wurde erneut durch Zentrifugation (15 min, 14800 rpm) und Redispergieren im gleichen Volumen (1 mL) mittels Ultraschallsonotrode (MS2, Puls 0,8, Amplitude 80 %, 10 s) redispergiert. Die Synthese ist in **Abbildung 57** schematisch dargestellt.

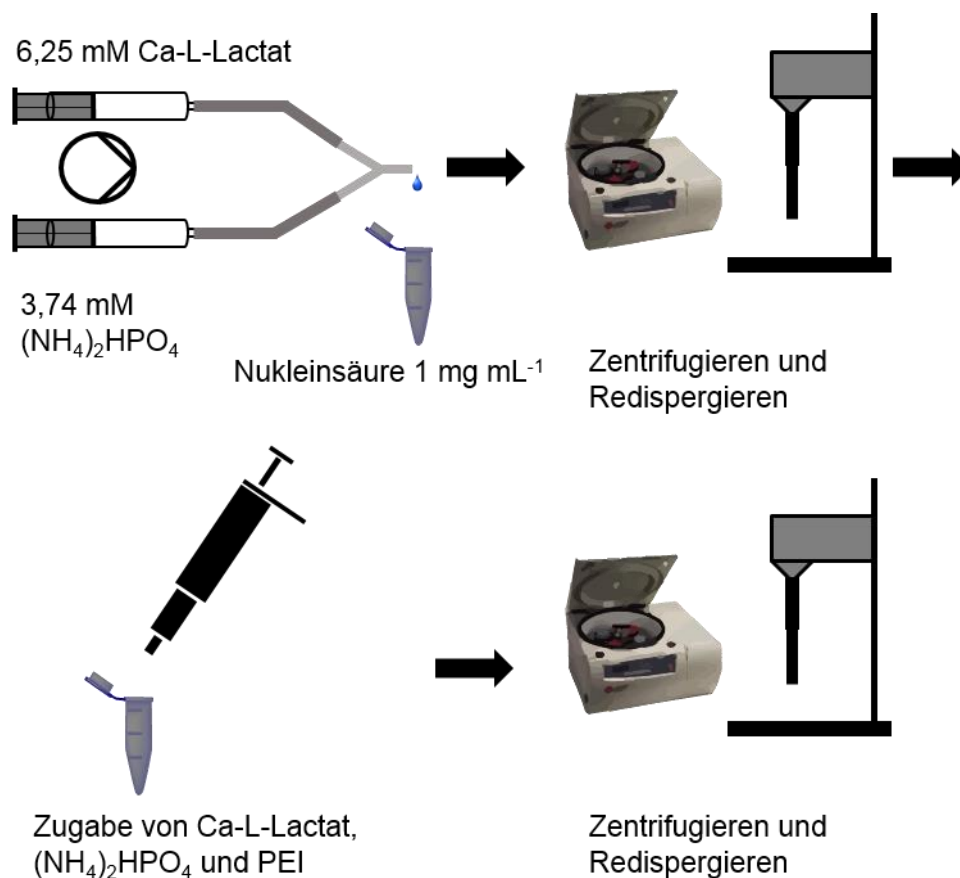


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Synthese der CaP-Nukleinsäure-CaP-PEI-Partikel

Die Zusammensetzung der Partikel wurde folgendermaßen charakterisiert. Die Konzentration an Nukleinsäure wurde durch UV/Vis-Spektrometrische Messungen des Überstandes der ersten Zentrifugation ermittelt. Die Konzentration an Nukleinsäure im Überstand wurde aus der Absorption bei 260 nm (im Falle von Oligo647 bei 650 nm) ermittelt. Über die Differenz der eingesetzten Menge an Nukleinsäure und der Menge im Überstand ließ sich die Konzentration an Nukleinsäure in der kolloidalen Dispersion errechnen.

Die Konzentration an Calcium in der Dispersion wurde durch Atomabsorptionsspektrometrie ermittelt. Hierfür wurde die Dispersion in verdünnter HCl aufgelöst und mit einem Atomabsorptionsspektrometer (Thermo Electron, M-Serie) analysiert.

Größe und Zetapotenzial der Partikel wurden mittels DLS und REM bestimmt. Für REM-Untersuchungen wurde die Partikeldispersion auf einen REM-Träger getropft und bei 37 °C im Trockenschrank getrocknet. Vor der Mikroskopie wurden die Proben für 30 s mit Gold-Palladium (80:20) gesputtert.

Anhand der Konzentration an Calcium und der Partikelgröße ließ sich mittels Formel 2 die Partikelanzahl abschätzen.

6.1.2 Synthese der Ca-PEI-Nukleinsäure-SiO₂-SH-Partikel

Nanopartikel des schematischen Aufbaus CaP-PEI-Nukleinsäure-SiO₂-SH wurden mit jeweils einer der Nukleinsäuren DNA, siRNA oder Oligo647 funktionalisiert. Die Synthese war bei allen Nukleinsäuren gleich und wurde wie in Quelle⁴¹ beschrieben durchgeführt.

CaP-PEI-Nanopartikel wurden über simultanes Pumpen von wässriger Calcium-L-Lactatlösung (18 mM, pH 10), Diammoniumhydrogenphosphatlösung (10,8 mM, pH 10) und wässriger PEI-Lösung (2 mg mL⁻¹) in 20 mL Reinstwasser gefällt. Dabei wurden innerhalb von einer Minute je 5 mL der Calcium-L-Lactatlösung und Diammoniumhydrogenphosphatlösung sowie 7 mL der PEI-Lösung zu der Wasservorlage gepumpt. Die kolloidale Dispersion wurde 20 min gerührt. Zur Beladung mit Nukleinsäuren wurde 1 mL der kolloidalen Dispersion mit 100 µL (im Falle von siRNA und Oligo-647 nur 50 µL) einer Nukleinsäurelösung (1 mg mL⁻¹) gemischt und für 10 min inkubiert. Die mit Nukleinsäure beladenen Nanopartikel wurden in Anlehnung an den Stöber-Prozess mit einer Silikaschale funktionalisiert. Dazu wurden 1,1 mL der CaP-PEI-

Nukleinsäure-Dispersion in eine Lösung von 5 μL Tetraorthosilikat (TEOS) und 2,6 μL NH_3 (30-33 %) in 4 mL Ethanol gegeben. Das Gemisch wurde für ca. 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde durch Zentrifugation (30 min, 20000 g) und Redispergieren in 1 mL Wasser mittels Ultraschallsonotrode (MS7, Puls 0,8, Amplitude 70 %, 10 s) aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurde die Oberfläche der Partikel über Silanisierung mit Thiolen funktionalisiert. Dazu wurden 5 μL (3-thiolpropyl)trimethoxy-silan in 4 mL Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 1 mL der CaP-PEI-Nukleinsäure- SiO_2 -Dispersion wurde für 8 h gerührt. Durch Zentrifugation (30 min, 20000 g) und Redispergieren in 1 mL Wasser mittels Ultraschallsonotrode (MS7, Puls 0,8, Amplitude 70 %, 10 s) wurde das Reaktionsgemisch aufgereinigt.

Die Zusammensetzung der Partikel wurde, wie bereits für das CaP-Nukleinsäure-CaP-PEI-System beschrieben, charakterisiert. Die Konzentration an Nukleinsäure wurde durch UV/Vis-Spektrometrische Messungen ermittelt. Die Dispersion wurde hierzu in verdünnter HCl oder 5 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) aufgelöst. Die Konzentration an Nukleinsäure wurde aus der Absorption bei 260 nm (im Falle von Oligo647, bei 650 nm) ermittelt. Zumeist war schon vor dem charakteristischen Nukleinsäuresignal eine erhöhte Grundlinie zu messen. Daher wurde zur Berechnung zunächst die Differenz der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 320 nm gebildet.

6.1.3 Synthese der CaP-Nukleinsäure-PLGA-PEI-Partikel

Nanopartikel des schematischen Aufbaus CaP-Nukleinsäure-PLGA-PEI wurden mit jeweils einer der Nukleinsäuren siRNA oder Oligo647 funktionalisiert. Die Synthese war bei beiden Nukleinsäuren gleich und wurde wie in Quelle⁴⁶ beschrieben durchgeführt.

Zunächst wurden 105 μL einer Calcium-L-Lactatlösung (6,25 mM, pH 9) und 105 μL einer Diammoniumhydrogenphosphatlösung (3,74 mM, pH 9) zu 40 μL einer Nukleinsäurelösung gegeben (4 mg mL^{-1}). Dies führte zur Fällung funktionalisierter Calciumphosphatnanopartikel. Nach Zugabe von acetyliertem BSA (20 μL , 10 mg mL^{-1}) wurde die kolloidale Dispersion unter Eiskühlung mittels Ultraschallsonotrode (MS3, Puls 0,8, Amplitude 70 %) in 750 μL einer PLGA-Lösung (13,3 mg mL^{-1}) in Dichlormethan emulgiert. Diese Emulsion 1 (E_1) wurde

umgehend unter Eiskühlung in 3 mL 1 %iger Polyvinylalkohollösung emulgiert. Diese Emulsion 2 (E₂) wurde bei Raumtemperatur gerührt, bis das Verdampfen des Dichlormethans zur Fällung der CaP-Nukleinsäure-PLGA-Partikel führte (ca. 4 h). Die Dispersion wurde durch Zentrifugation (30 min, 14800 rpm) aufgereinigt. Nach Redispergieren wurden die Partikel lyophilisiert (0,32 mbar, 10 °C). Die getrockneten Partikel konnten durch Redispergieren in einer PEI-Lösung (2 mg mL⁻¹) im Verhältnis (m(Partikel)/m(PEI)) 1:2 mit PEI beschichtet werden. Durch Zentrifugieren (30 min, 14800 rpm) und Redispergieren wurde freies PEI aus der Dispersion entfernt. Die Beschichtung mit PEI erfolgte direkt vor der Anwendung der Partikel.

In **Abbildung 58** sind die Emulsionsprozesse der Synthese schematisch dargestellt.

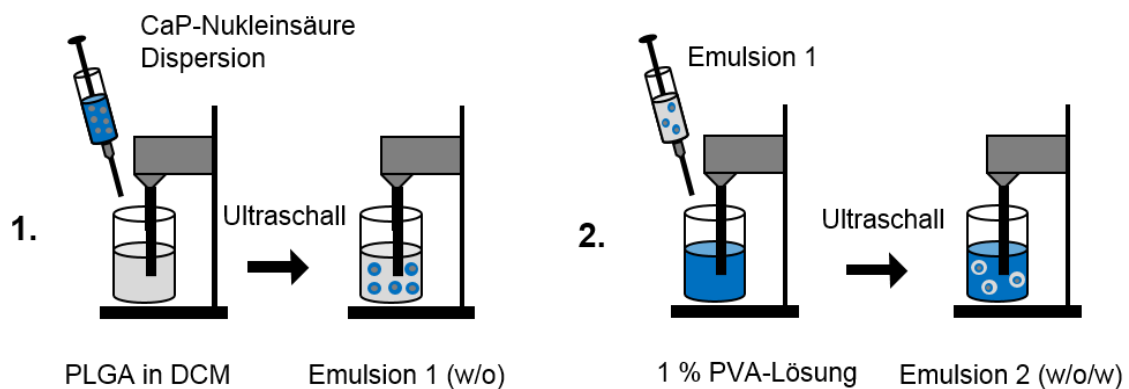


Abbildung 58: Schematische Darstellung der Synthese der CaP-Nukleinsäure-PLGA Partikel.

Die Zusammensetzung der Partikel wurde, wie bereits für das CaP-Nukleinsäure-CaP-PEI-System beschrieben wurde, charakterisiert. Auch bei diesem System wurde die Differenz aus Absorption 260 nm und Absorption 320 nm gebildet. Die Konzentration an Calcium wurde nicht ermittelt.

6.1.4 Synthese der CaP-Nukleinsäure-CaP-Nukleinsäure-Partikel

Nanopartikel des schematischen Aufbaus CaP-Nukleinsäure-CaP-Nukleinsäure wurden mit jeweils einer der Nukleinsäuren siRNA oder Oligo647 funktionalisiert. Die Synthese war bei beiden Nukleinsäuren gleich und wurde wie in Quelle⁹⁵ beschrieben durchgeführt.

Mittels einer Peristaltikpumpe wurden simultan gleiche Volumina einer Calcium-L-Lactatlösung (6,25 mM, pH 9) und einer Diammoniumhydrogenphosphatlösung (3,74 mM, pH 9) in ein Reaktionsgefäß gepumpt und gerührt. Mit einer Pipette wurden nach 30 Sekunden 1 mL der Dispersion entnommen und zu 0,2 mL einer Nukleinsäurelösung (1 mg mL⁻¹) gegeben. Die Dispersion wurde gevortext. Anschließend wurden erneut jeweils 0,5 mL der Calcium-L-Lactatlösung (6,25 mM, pH 9) und der Diammoniumhydrogenphosphatlösung (3,74 mM, pH 9), sowie 0,2 mL der Nukleinsäurelösung (1 mg mL⁻¹) zu der Dispersion pipettiert. Es wurde erneut gevortext.

Die Zusammensetzung der Partikel wurde, wie bereits für das CaP-Nukleinsäure-CaP-PEI-System beschrieben wurde, charakterisiert. UV/Vis-Spektrometrische Messungen wurden nicht durchgeführt, da die Konzentration an Nukleinsäure aus der Synthesevorschrift hervorging. Zur Bestimmung des partikulären Calciumgehaltes wurde die Dispersion bei 14800 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in verdünnter HCl gelöst und der Calciumgehalt wurde mittels AAS bestimmt.

6.1.5 Ostim®-PEI-Nukleinsäure

Ostim® wurde in Anlehnung an Quellen^{134, 135} mit PEI und siRNA oder Oligo647 funktionalisiert.

0,5 mL einer 6 %igen Ostim® Suspension (aap, Dieburg) wurden mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 mL verdünnt. 1 mL dieser Suspension wurde mit 9 mL einer sterilen PEI-Lösung (1 mg mL⁻¹) versetzt. Diese Lösung wurde für 3 min mit dem Ultraschallprozessor (Sonotrode MS7; 50 % Amplitude; 0,8 Puls) dispergiert. Es wurde für 30 min bei 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel wurden im gleichen Volumen Wasser mittels Ultraschallprozessor für 2 min redispergiert.

Zur Beladung mit Nukleinsäuren wurde 1 mL dieser Dispersion mit 4 µL einer Nukleinsäurelösung (4,9 mg mL⁻¹) versetzt.

Die Zusammensetzung der Partikel wurde, wie bereits für das CaP-Nukleinsäure-CaP-PEI-System beschrieben wurde, charakterisiert. UV/Vis-Spektrometrische Messungen wurden nicht durchgeführt, da die Konzentration an Nukleinsäure aus der Synthesevorschrift hervorging. Zur Bestimmung des partikulären Calciumgehaltes wurde die Dispersion bei 14800 rpm für 15 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in verdünnter HCl gelöst und der Calciumgehalt wurde mittels AAS bestimmt.

6.2 Gefriertrocknung

Partikel des schematischen Aufbaus CaP-Nukleinsäure-CaP-PEI und CaP-PEI-Nukleinsäure-SiO₂-SH wurden, falls sie nicht umgehend verwendet wurden, gefriergetrocknet. Diesen Partikelsorten wurde zuvor der Kryoprotektor Trehalose hinzugesetzt, sodass eine Konzentration von ca. 10 mg mL⁻¹ vorlag. Partikel des schematischen Aufbaus CaP-Nukleinsäure-PLGA wurden ohne Zusatz von Trehalose gefriergetrocknet. Zum Gefriertrocknen wurden zunächst alle kolloidalen Dispersionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Dispersionen bei 0,32 mbar und -10 °C in einem Alpha 2-4 LSC Lyophilisator (Martin Christ) gefriergetrocknet.

6.3 Zellbiologische Experimente

Alle zellbiologischen Experimente wurden unter Anwendung steriler Arbeitstechniken und unter einer Sterilbank durchgeführt. Bei der Synthese funktioneller Nanopartikel wurde ebenfalls so steril wie möglich gearbeitet und unter Verwendung von sterilen Lösungen.

Bei der Kultivierung von Zellen in 24er *well-plates* wurden stets 500 µL Medium pro *well* verwendet. Bei der Kultivierung von Zellen in 96er *well-plates* wurden stets 100 µL Medium pro *well* verwendet.

6.3.1 Lagerung und Kultivierung der Zellen

Zur Lagerung der Zellen wurden ca. 10^6 Zellen in 1 mL Zellkulturmedium suspendiert. Es wurden 100 µL DMSO (Dimethylsulfoxid) hinzugefügt. Die Zellen wurden zunächst bei -80 °C eingefroren und für 24 h gelagert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Bevor ein Experiment gestartet wurde, wurden die Zellen aufgetaut und nach Austauschen des Mediums wurden die Zellen mindestens eine Woche lang kultiviert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen, abhängig von der Zelldichte in der Kulturflasche, subkultiviert. Dazu wurden adhärente Zellen nach Waschen mit PBS durch 3 minütige Inkubation mit 0,05 % Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurde Medium hinzugefügt und die Zellen wurden für 3 min bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium redispergiert. Die gewünschte Anzahl an Zellen wurde subkultiviert. Abhängig vom Zellwachstum wurde stets bei 70-100 % Konfluenz subkultiviert. Die Konzentration an Zellen wurde allgemein mit einer Neubauerkammer bestimmt. **Tabelle 6** zeigt die Zusammensetzung der Zellkulturmedien der verschiedenen Zellen. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Tabelle 6: Zellkulturmedien der verschiedenen Zellen. DMEM – *Dulbeccos's Modified Eagle Medium*; RPMI-1640 – *Roswell Park Memorial Institute*; α -MEM – *Minimum Essential Medium α*

Zelllinie	Klassifizierung	Herkunft	Zellkulturmedium
HeLa	Epithel	Mensch/ Zervixkarzinom	DMEM + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹ P/S
HeLa- eGFP	Epithel	Mensch/ Zervixkarzinom	DMEM + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹ P/S + 50 μ g mL ⁻¹ Geneticin
MG-63	Fibroblast	Mensch/ Osteosarkom	DMEM + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹ P/S
Huh7	Epithelähnlich	Mensch/ Hepatokarzinom	DMEM + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹ P/S + 1% NEAA
CV-1	Fibroblast	Affe/ Niere	DMEM + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹ P/S + 1% NEAA
Mode-K	Epithel	Maus/ Darm	DMEM + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹ P/S + 2 mM L- Glutamin
MC3T3	Fibroblast/ Osteoblast	Maus/ Schädelknochen	α MEM + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹ P/S
U937	Monozyten/ Makrophagen	Mensch/ Lymphom	RPMI-1640 + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹ + 10 mM Hepes + 2 mM L-Glutamin
THP-1	Monozyten/ Makrophagen	Mensch/ Leukämie	RPMI-1640 + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹ + 10 mM Hepes + 2 mM L-Glutamin
4T1	Epithel	Maus/ Brustkarzinom	RPMI-1640 + 10 % FBS + 100 U mL ⁻¹
hMSC	Stammzellen	Mensch/ Knochenmark	Mesenchymal stem cells (MSC) growth medium

6.3.2 Transfektion von Zellen

Zellen wurden etwa 12-24 h vor der Transfektion in 24er *well-plates* oder 96er *well-plates* ausgesät. Dabei wurden 25000 Zellen pro *well* in 24er *well-plates* ausplattiert, während 5000 Zellen pro *well* (2000 Zellen im Fall von CV-1 Zellen) in 96er *well-plates* ausgesät wurden.

Transfektion mittels Nanopartikel:

Kolloidale Dispersionen der Nanopartikel wurden mit den entsprechenden Zellkulturmedien verdünnt, um die gewünschte Konzentration an DNA zu erhalten. Anschließend wurde das Zellkulturmedium der Zellen durch das Nanopartikel enthaltende Medium ausgetauscht. Nach etwa 12 h Inkubation wurde das Zellkulturmedium erneut ausgetauscht. Die Zellen wurden weitere 48 h kultiviert, bevor die Transfektionseffizienz und die Toxizität gemessen wurden.

Transfektion mittels Lipofectamine® 2000:

Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsagens Lipofectamine® 2000 transfiziert. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.¹⁰⁶

Pro *well* einer 24er *well-plate* wurden 0,8 µg DNA mit 50 µL Zellkulturmedium ohne FBS gemischt. In einem separaten Gefäß wurde 1 µL Lipofectamine® 2000 Reagenz mit 50 µL Zellkulturmedium ohne FBS gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation wurden beide Lösungen miteinander gemischt und erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µL dieser Lösung wurde mit 400 µL Zellkulturmedium versetzt und zu den Zellen gegeben.

Für 96er *well-plates* wurden nur 0,2 µg DNA und 0,25 µL Lipofectamine® 2000 Reagenz pro *well* verwendet. DNA und Lipofectamine® 2000 Reagenz wurde jeweils in 25 µL Zellkulturmedium ohne FBS gelöst. 50 µL der Mischung wurden mit Zellkulturmedium auf 100 µL aufgefüllt und zu den Zellen gegeben.

Inkubationszeiten und Analyse des Zellversuchs waren für Nanopartikel und Lipofectamine® gleich. In dieser Arbeit werden die Bezeichnungen Lipofectamine® und Lipofectamine® 2000 synonym verwendet und bezeichnen stets Lipofectamine® 2000.

Die Toxizität wurde mittels MTT-Test erfasst. Die Durchführung ist in Abschnitt 6.3.8 beschrieben. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Mikroskopie, qPCR oder FACS-Analyse bestimmt. Die Durchführungen von qPCR und FACS-Messung sind in Abschnitt 6.3.6 und Abschnitt 6.3.7 beschrieben.

Zur mikroskopischen Auswertung wurde das Medium durch PBS (*phosphate buffered saline*) getauscht und die Zellen wurden mit einem Keyence BZ900-Mikroskop untersucht. Dazu wurden sowohl im Durchlichtkanal als auch im Fluoreszenzkanal (GFP; Ex470/40, DM495, BA 535/50) Bilder aufgenommen. Bei den Fluoreszenzbildern wurde darauf geachtet, die Belichtungszeit konstant zu halten. Die Zellen auf beiden Bildern wurden gezählt, und durch Formel (9) konnte die Transfektionseffizienz ($TE(\%)$) berechnet werden.

$$TE(\%) = \frac{N(\text{fluoreszierende Zellen})}{N(\text{gesamte Zellen})} \cdot 100 \quad (9)$$

6.3.3 Genstummschaltung von Zellen

Stummschaltung von eGFP in HeLa-eGFP-Zellen mit Nanopartikeln:

HeLa-eGFP-Zellen wurden etwa 12-24 h vor der Zugabe der Nanopartikel in 24er *well-plates* ausgesät. Dabei 25000 Zellen wurden pro *well* ausplattiert.

Kolloidale Dispersionen der Nanopartikel wurden mit Zellkulturmedium verdünnt, um die gewünschte Konzentration an siRNA zu erhalten. Anschließend wurde das Zellkulturmedium der Zellen durch das Nanopartikel enthaltende Medium ausgetauscht. Nach etwa 12 h Inkubation wurde das Zellkulturmedium erneut ausgetauscht. Die Zellen wurden weitere 48-72 h kultiviert, bevor die Genstummschaltungseffizienz und die Toxizität gemessen wurden. Die Toxizität wurde mittels MTT-Test erfasst. Die Durchführung ist in Abschnitt 6.3.8 beschrieben. Die Genstummschaltungseffizienz wurde mittels Mikroskopie, qPCR oder FACS-Analyse bestimmt. Die Durchführungen von qPCR und FACS-Messung sind in Abschnitt 6.3.6 und Abschnitt 6.3.7 beschrieben.

Zur mikroskopischen Auswertung wurde das Medium durch PBS (*phosphate buffered saline*) getauscht und mittels Keyence BZ900-Mikroskop untersucht. Dazu wurden sowohl im Durchlichtkanal als auch im Fluoreszenzkanal (GFP;

Ex 470/40, DM 495, BA 535/50) Bilder aufgenommen. Bei den Fluoreszenzbildern wurde darauf geachtet die Belichtungszeit konstant zu halten, um die Vergleichbarkeit mit der unbehandelten Kontrolle zu gewährleisten. Die Zellen auf beiden Bildern wurden gezählt und durch Formel (10) konnte die Genstummschaltungseffizienz (GS(%)) berechnet werden.

$$GS(\%) = \frac{\left(\begin{array}{c} \text{nicht fluoreszierende} \\ \text{Zellen [\%]} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{nicht fluoreszierende} \\ \text{Zellen der Kontrolle [\%]} \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{c} \text{fluoreszierende Zellen} \\ \text{der Kontrolle [\%]} \end{array} \right)} \cdot 100 \quad (10)$$

Stummschaltung von TNF- α in Mode-K-Zellen mit Nanopartikeln:

Mode-K-Zellen wurden etwa 24 h vor Zugabe der Nanopartikel in einer Dichte von 50000 Zellen pro *well* in 24er *well-plates* ausgesät.

Die funktionellen Nanopartikeldispersionen wurden mit Zellkulturmedium verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Anschließend wurde das Medium der Zellen durch das Nanopartikel enthaltende Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden 6 h mit den Nanopartikeln inkubiert. Nun wurde LPS (*lipopolysaccharide*) in Zellkulturmedium gelöst ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) und das Medium wurde durch diese Lösung ausgetauscht. Zur Stimulierung der TNF- α -Expression wurden die Zellen 4 h mit LPS inkubiert. Anschließend wurde die Expression von TNF- α mittels qPCR analysiert.

Stummschaltung mittels Lipofectamine®:

Als Kontrolle wurde die Stummschaltung der Gene mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsagens Lipofectamine® 2000 durchgeführt. Die Stummschaltung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.¹⁰⁶

Pro *well* einer 24er *well-plate* wurden 20 pmol siRNA (0,28 μg bei eGFP siRNA) mit 50 μL Zellkulturmedium ohne FBS gemischt. In einem separaten Gefäß wurde 1 μL Lipofectamine® 2000 Reagenz mit 50 μL Zellkulturmedium ohne FBS gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation wurden beide Lösungen miteinander gemischt und erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 μL dieser Lösung wurden mit 400 μL Zellkulturmedium versetzt und zu den Zellen gegeben.

Inkubationszeiten und Analyse des Zellversuchs waren für Nanopartikel und Lipofectamine® gleich.

6.3.4 Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen

Zellen wurden etwa 12-24 h vor Zugabe der Nanopartikel entweder in 24er *well-plates* oder 8 *well-culture-slides* (Falcon, USA) ausplattiert. Die Zelldichte betrug jeweils 50000 Zellen pro *well*.

Die kolloidalen Nanopartikeldispersionen wurden in Zellkulturmedium verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Anschließend wurde das Medium der Zellen durch das Nanopartikel enthaltende Medium ausgetauscht.

Die Zellen wurden für die gewünschte Zeit mit den Nanopartikeln inkubiert. Die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen wurde mit einem Keyence BZ900-Mikroskop oder mittels FACS analysiert. Vor der Mikroskopie wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Wurden die Zellen in 24er *well-plates* kultiviert, so wurde die Aufnahme der Nanopartikel umgehend durch licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen charakterisiert.

Wurden die Zellen in 8 *well culture slides* kultiviert, so wurden die Zellen vor dem Mikroskopieren fixiert und angefärbt. Das Fixieren und Anfärben von Zellen wird in Abschnitt 6.3.5 beschrieben. Die Durchführung der FACS-Messungen ist in Abschnitt 6.3.7 beschrieben.

6.3.5 Fixieren und Anfärben der Zellen

Die Zellen wurden zunächst 3x mit PBS gewaschen. Zum Fixieren der Zellen wurden diese mit einer 3,7 %igen Lösung von Formaldehyd in PBS benetzt. Die Zellen wurden für 20 min bei Raumtemperatur mit dieser Lösung inkubiert. Durch die Vernetzung der Proteine mit Formaldehyd ließ sich der Metabolismus der Zellen stoppen und die Morphologie der Zellen konservieren.^{205, 206}

Anschließend wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen. Die Zellmembran wurde mit CellMask® angefärbt.²⁰⁷ Dazu wurde die Stammlösung 1:1000 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 37 °C mit dieser Lösung inkubiert.

Die Zellen wurden erneut 2x mit PBS gewaschen. Zum Anfärben der Zellkerne wurden die Zellen mit DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindol) inkubiert. DAPI bindet an die chromosomale DNA wodurch der Zellkern markiert werden kann.²⁰⁸ Die

Stammlösung wurde 1:50 in PBS verdünnt. Die Zellen wurden für 10-15 min bei 37 °C mit dieser Lösung inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen erneut 2-3x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von *mounting* Medium (FluorSave™, Calbiochem) und Bedecken der Zellen mit einem Deckgläschen konnten die Zellen bis zur Mikroskopie bei 4 °C gelagert werden.

Licht- und Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Keyence BZ900-Mikroskop durchgeführt.

6.3.6 qPCR

Um den relativen Gehalt einer spezifischen mRNA zu erhalten wurde qPCR durchgeführt. Diese gliederte sich in verschiedene Teilschritte, die im Folgenden beschrieben werden.

Auflösen der Zellen:

Die Zellen wurden, nach Waschen mit PBS, aus jedem *well* durch Trypsin/EDTA gelöst. Nach 3 minütiger Inkubation wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension aus jedem *well* wurde zum Zentrifugieren (900 rpm, 3 min) jeweils in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellkulturmedium abgesaugt. Durch Zugabe von RLT Lysis-Puffer (Qiagen) wurden die Zellen aufgelöst. Nach Zugabe von Lysis-Puffer konnten die Zellen bis zur Isolation der RNA bei -80 °C gelagert werden.

Isolation der Gesamt-RNA:

Die Gesamt-RNA wurde mittels *RNeasy*-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Proben wurden für 30 s geschüttelt. Anschließend wurde 300-350 µL Ethanol (70 %) hinzugegeben. Das gesamte Volumen wurde auf eine *RNeasy*-Säule aufgetragen und für 30 s bei 10500 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule aufgetragen und bei gleichen Parametern zentrifugiert. Nun wurde der Durchfluss verworfen und 350 µL RW1-Puffer wurden auf die Säule gegeben. Es wurde erneut bei gleichen Parametern zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Pro Probe wurden 10 µL DNase und 70 µL RDD-Puffer gemischt. Es wurden jeweils 80 µL auf die Säule pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µL RW1-Puffer

hinzugegeben und für 1 min bei 10500 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 2 mL Gefäß gestellt. Nun wurde zweimal mit 500 µL RPE-Puffer gewaschen. Dazwischen wurde für je 30 s bei 10500 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde zum Trocknen der Probe für 2 min bei 10500 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde nun in eine 1,5 mL Gefäß gestellt. 30-50 µL RNase-freies Wasser wurde in die Mitte der Säule pipettiert und 3 min inkubiert. Abschließend wurde 1 min bei 10500 rpm zentrifugiert. Die RNA war nun im Wasser gelöst und konnte zur Synthese der cDNA verwendet werden. Die Konzentration an RNA konnte mittels NanoDrop®-Spektrometer ermittelt werden.

Synthese der cDNA (*complementary DNA*):

Pro Probe wurden 0,5 µL RandomPrimer (3 mg mL⁻¹, Invitrogen) mit 0,5 µL OligodT (oligo-Desoxythymidin, 0,5 mg mL⁻¹, Invitrogen) gemischt und zu 13 µL der isolierten RNA gegeben (ca. 1 µg). Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Lösung aus 4 µL 5x *first-strand-buffer* (Promega), 1 µL dNTP (Desoxynucleosidtriphosphate, 10 mM, Promega) und 1 µL M-MLV reverse Transkriptase (Promega) zu jeder Probe gegeben. Die Synthese der cDNA fand bei 42 °C für 1 h statt. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Proben für 5 min bei 90 °C inkubiert. Anschließend konnten die Proben bei -20 °C gelagert werden.

qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*):

Alle Proben wurden 1:30 oder 1:50 mit Wasser verdünnt. Pro Probe wurden nun 4,8 µL cDNA mit 19,8 µL Wasser gemischt. Zur Erstellung von Standards für eine Kalibrationsgerade wurden von jeder 1:30 oder 1:50 verdünnten Probe 2 µL in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Für den ersten Standard wurden 14,4 µL der cDNA mit 9,6 µL Wasser verdünnt. Die Konzentration an cDNA war hier in etwa dreimal so hoch wie in den Proben. Der zweite Standard bestand aus 4,8 µL cDNA und 19,8 µL Wasser. Die Konzentration an cDNA entsprach in etwa der Konzentration in den Proben. Für den dritten und vierten Standard wurde das cDNA-Gemisch 1:10 und 1:100 verdünnt. Es wurden erneut je 4,8 µL cDNA mit 19,8 µL Wasser verdünnt. Die Konzentration an cDNA in diesen Standards betrug also in etwa 1/10 und 1/100 der Konzentration in den Proben.

Für die qPCR wurden von diesen Lösungen je 5 µL (ca. 5-20 ng cDNA) mit 5 µL der Primerpaare (50-900 nM) für das gewünschte Gen und 10 µL des *SYBR-Green-Mixes* gemischt. Der *SYBR-Green-Mix* bestand aus dem Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green*, der der Quantifizierung der doppelsträngigen DNA diente, und dem Farbstoff ROX, der zur Normalisierung des Fluoreszenzsignals diente. Desweiteren war hier die DNA-Polymerase enthalten, die die cDNA in jedem Zyklus vervielfältigte. *SYBR-Green* und Enzym waren als *SYBR-Green-Master-Mix* von *Life technologies* erhältlich. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Die relative Expression eines Gens wurde durch Normierung mit dem *housekeeping-Gen* RPS9 (*ribosomal protein S9*) erhalten.

Die qPCR wurde in einem *7500 Fast Real-Time System* (Applied Biosystems, *Life technologies*) durchgeführt und mit der *7500 Fast Real-Time System* Software ausgewertet.

Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte über folgende Zyklen.

Stufe 1:

Stufe 1 wurde einmal durchgeführt. Die cDNA wurde bei 95 °C für 10 min denaturiert.

Stufe 2:

Stufe 2 wurde 40x wiederholt. Die doppelsträngige DNA wurde bei 95 °C für 15 s denaturiert. Bei 58 °C erfolgte für 30 s die Hybridisierung der *Primer* an die DNA. Anschließend fand die Elongation für 30 s bei 72 °C statt. Die Daten wurden jeweils am Ende dieses Schrittes aufgenommen.

Stufe 3:

Stufe 3 wurde einmal durchgeführt. Hier wurde nach dem letzten Zyklus von Stufe 2 eine Schmelzkurve der DNA durch Erhöhung der Temperatur von 60 °C bis 95 °C aufgenommen.

Für die qPCR verwendete Primersequenzen:

RPS9:

5' CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC

3' TGACGTTGGCGGATGAGCACA

eGFP:

5`CTACGGCGTGCAGTGCTTCAG

3`CTCGGCGCGGGTCTTGTAG

TNF- α :

5' CAATGCACAGCCTTCCTCACAG

3' CCCGGCCTTCCAAATAAATACAT

KC:

5`CATGGCTGGGATTACCTC

3`AAGCCAGCGTTCACCAGAC

IP10:

5`CTCTCCATCACTCCCCTTTACCC

3`GCTTCGGCAGTTACTTTTGTCTCA

6.3.7 FACS (*fluorescence activated cell sorting*)

Zur FACS-Analyse wurden die Zellen, nach Waschen mit PBS, durch Trypsin/EDTA aus den *wells* gelöst. Nach 3 minütiger Inkubation wurde frisches Zellkulturmedium hinzugefügt. Nach Zentrifugieren wurde das Medium verworfen und die Zellen wurden in FACS-Puffer (PBS + 2 % FBS + 2 mM EDTA) resuspendiert. Zur Unterscheidung von lebendigen und toten Zellen wurde der Farbstoff 7 AAD *viability staining solution* (eBiosciences, USA) nach Herstellerangaben zu den suspendierten Zellen gegeben.

Die Zellsuspensionen wurden umgehend mit einem *FACS ARIA II* oder *FACS LSR II* von *BD Biosciences* (Heidelberg, Deutschland) analysiert.

6.3.8 MTT-Test

Die Vitalität der Zellen wurde parallel zur Mikroskopie mittels MTT-Test bestimmt. Dazu wurde MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zunächst in einer Konzentration von 5 mg mL⁻¹ in PBS gelöst. Diese Lösung wurde mit Zellkulturmedium aufgefüllt sodass MTT in einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ vorlag. Das Zellkulturmedium der Zellen wurde entfernt. Anschließend wurden pro *well* 300 μ L der MTT-Lösung zu den Zellen gegeben. Es wurde für 90 min bei 37 °C inkubiert. Nun wurde die MTT-

Lösung wieder abgesaugt. Der während der Inkubation ausgefallene, blaue Farbstoff Formazan wurde in 300 µL DMSO (Dimethylsulfoxid) pro *well* gelöst und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption der Überstände wurde bei 570 nm photometrisch bestimmt. Pro *well* wurden dazu dreimal 100 µL in eine 96er *well-plate* pipettiert. Die Absorption konnte dann mit einem Multiscan FC (Thermo scientific) bestimmt werden.

6.3.9 *In vivo*-Experimente

Die *in vivo*-Experimente wurden in Mäusen des Stammes BALB/c durchgeführt. Die Mäuse wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) gekauft und im Tierstall des Universitätsklinikums Essen in IVC2-Käfigen (*individually ventilated cages*) unter pathogenfreien Bedingungen gehalten.

Rektale Verabreichung der Nanopartikel:

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt. Anschließend wurden die Nanopartikel in einem Volumen von 100-150 µL rektal mittels eines Katheters (20G, 1,3 mm · 3,3 mm) ohne Kanüle verabreicht. Gefriergetrocknete Nanopartikel wurden dafür redispergiert, sodass die gewünschte Konzentration an Nukleinsäure in der Dispersion vorlag. Für die Transfektion von Mäusen mit dem Plasmid pcDNA3-eGFP wurden den Mäusen jeweils 50 µg des Plasmids mit CaP-DNA-CaP-PEI-Nanopartikeln gegeben. Die Transfektion wurde an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 5 nach der Gabe der Nanopartikel mittels FACS und qPCR untersucht. Zur Stummschaltung von entzündungsrelevanten Genen im DSS-*Colitis*-Mausmodell wurden an den Tagen 2-5 jeweils 12 µg siRNA mit Hilfe von CaP-siRNA-PLGA-PEI-Nanopartikeln verabreicht.

Etablierung der DSS-*Colitis*:

BALB/c-Mäuse erhielten über das Trinkwasser für sechs Tage 4 % DSS (*dextran sodium sulfate*, Dextran Natriumsulfat)

Analyse der Gewebe:

Vor Entnahme der Organe wurden die Mäuse geopfert. Der Darm wurde entnommen und mit PBS gespült.

Für die qPCR wurde die RNA aus einer Biopsie des Darms mittels *Fibrous Tissue Kit*[®] von Qiagen isoliert. Die RNA wurde anschließend, wie in Abschnitt 6.3.6 beschrieben wurde, für die qPCR verwendet.

Um eine Suspension intestinaler Epithelzellen zu erhalten, wurde der Darm longitudinal aufgeschnitten. Der Darm wurde dann zunächst für 10 min mit 10 mL 1 mM Dithiothreitol (DTT) in PBS inkubiert und anschließend für 10 min bei 37 °C und 180 rpm auf einem Schüttler geschüttelt. Nun wurde der Darm erneut mit PBS gespült und danach in 20 mL warmen (37 °C) Hank's-Puffer (HBSS) + 0,75 mM EDTA für 15 min bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Der Darm wurde dann stark geschüttelt, um die intestinalen Epithelzellen mechanisch zu lockern. Der Überstand wurde entnommen. Es wurde mehrmals erneut mit 15 mL PBS geschüttelt bis der Überstand klar war. Die Überstände wurden vereint, mit einem 70 µm „cell strainer“ filtriert und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in FACS-Puffer resuspendiert.

Zur Unterscheidung der intestinalen Epithelzellen und CD45+ Zellen wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern für CD45 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS analysiert.

Die Lymphknoten wurden nach Entnahme über ein Sieb mit FACS-Puffer gemörsert. Anschließend wurde die Suspension bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Zellen befanden sich im Pellet und wurden in FACS-Puffer redispergiert und anschließend im FACS untersucht. Die RNA einer Biopsie der Lymphknoten konnte mittels *Fibrous Tissue Kit*[®] von Qiagen isoliert werden und für die qPCR verwendet werden.

6.4 Herstellung der Transportvehikel

6.4.1 Befüllen und Beschichten der Kapsel

Gelatinekapseln der Größe „M“ wurden bei torpac inc. (Fairfield, USA) bestellt. Im Lieferumfang enthalten, waren sowohl ein Trichter, ein Ständer für die Kapseln als auch ein Kolben (**Abbildung 59**). Diese sollten zum Befüllen der Kapseln mit Feststoffen dienen.

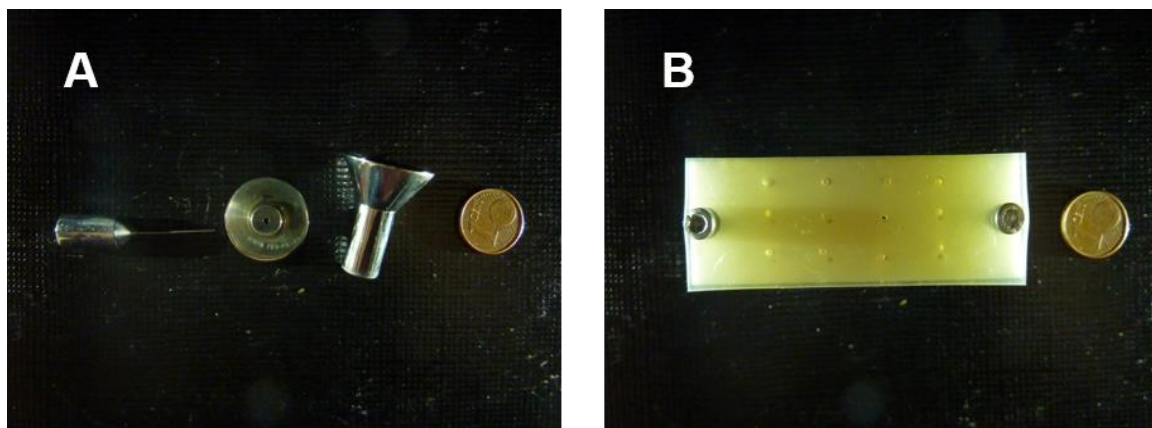


Abbildung 59: A – von links nach rechts, Kolben, Ständer der Kapsel, Trichter zum Befüllen; B – Kapselhalterung für die *dip-coating*-Beschichtung mit Eudragit® L 100

Vor dem Befüllen der Kapseln wurde zunächst die Masse der leeren Kapsel bestimmt. Die Kapseln bestanden aus einem längeren Kapselkörper, sowie aus einer etwas kürzeren Verschlusskappe. Der Kapselkörper konnte in den Kapselständer gestellt werden. Der Trichter wurde darauf gesetzt. Nun konnte die Kapsel mit gefriergetrockneten Calciumphosphat-Nanopartikeln, unter zu Hilfenahme des Kolbens, befüllt werden. Anschließend wurde die Kapsel mit der Verschlusskappe verschlossen. Die Masse der befüllten Kapsel wurde erneut bestimmt. Über die Differenz der Massen ließ sich die Menge der Nanopartikel (und Nukleinsäuren) in der Kapsel abschätzen.

Die befüllte Kapsel konnte nun mit Eudragit® L 100 über ein *dip-coating*-Verfahren beschichtet werden. Dazu wurden zunächst zwei Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Eudragit® hergestellt.

Eine 4 %ige Lösung von Eudragit® L 100 bestand aus:

8 g Eudragit® L 100 (Evonik, Darmstadt)

76 g Aceton (Bernd Kraft, Duisburg)

114 g Isopropanol (Bernd Kraft, Duisburg)
2 g Propylenglycol (Sigma-Aldrich, München)

Eine 21 %ige Lösung von Eudragit® L 100 bestand aus:

42 g Eudragit® L 100 (Evonik, Darmstadt)
58 g Aceton (Bernd Kraft, Duisburg)
87 g Isopropanol (Bernd Kraft, Duisburg)
13 g Propylenglycol (Sigma-Aldrich, München)

Zur Beschichtung wurde die Kapsel in der Kapselhalterung fixiert. Diese bestand aus einem Gestell aus PTFE, darauf war eine Silikonmatte (2 mm) angebracht (**Abbildung 59 B**). Die Silikonmatte enthielt Bohrungen mit einem Durchmesser von 1,2 mm. Die Kapseln konnten jeweils mit einer Seite in diesen Löchern fixiert werden, sodass der Großteil der Kapsel aus der Halterung herausragte. Nun konnte die Kapsel in die Eudragit®-Lösungen getaucht werden (*dip-coating*).

Zur Beschichtung wurde die Kapsel jeweils 2x von jeder Seite in beide Lösungen getaucht. Zwischendurch wurde die Kapsel jedes Mal für 25 min bei 37 °C im Trockenschrank zur Entfernung der Lösemittel getrocknet.

Abschließend wurde erneut die Masse der Kapsel bestimmt. Somit konnte der Massenanteil an Eudragit® bestimmt werden und dadurch konnte die Schichtdicke abgeschätzt werden.

6.4.2 Herstellung der Zäpfchen

Zur Herstellung der mit Nanopartikeln befüllten Zäpfchen wurde die PTFE-Form (Polytetrafluorethylen), die in **Abbildung 60** dargestellt ist, genutzt. Die geschlossene Form enthält durchgehende Bohrungen. Die Bohrungen hatten einen Durchmesser von 2 mm und eine Länge von 1,6 cm. Auf der einen Seite der Bohrung wurde der Kanal vergrößert, sodass ein Luer-Slip angesetzt werden konnte.

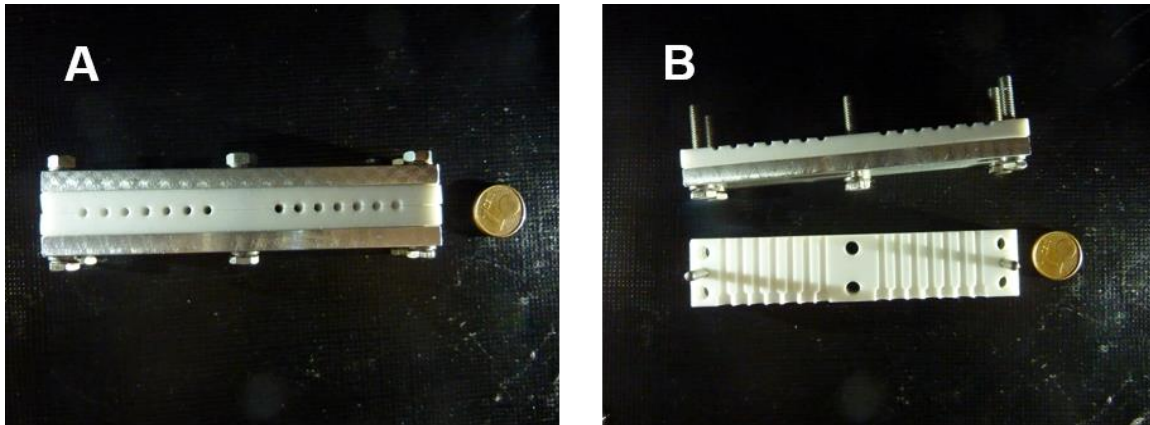


Abbildung 60: PTFE-Form für die Zäpfchenfertigung. A – geschlossen, zum Einspritzen des flüssigen Hartfetts; B – geöffnet, zur Entnahme der fertigen Zäpfchen.

Zur Herstellung der Zäpfchen wurde Hartfett (*adepts solidus*, Caelo) zunächst in einer 1 mL Spritze oder einer 2 mL Spritze bei 37 °C geschmolzen. Dazu wurde der Kolben entfernt und der Luer-Slip der Spritzen wurde zunächst verschlossen. Die gefriergetrockneten Partikel konnten nun in das flüssige Hartfett eingearbeitet werden. In etwa konnten 0,12 mg gefriergetrocknete Partikel in Trehalose pro mg Hartfett verwendet werden. Dabei entstand eine breiartige Masse. Die Partikel/Trehalose lagen dabei homogen verteilt im Hartfett vor.

Die geschlossene Zäpfchenform (**Abbildung 60A**) konnte mit einer gasdurchlässigen Membran (breathe easier, Diversified Biotech) verschlossen werden. Die breiartige Zäpfchenmasse konnte nun mit dem Kolben der Spritze in die Bohrungen gespritzt werden. Anschließend wurde das Zäpfchen bei 4 °C im Kühlschrank gehärtet. Die Entnahme der Zäpfchen erfolgte durch einfaches Öffnen der Form. Der Gehalt an Nukleinsäure im Zäpfchen wurde durch Bestimmen der Masse des Zäpfchens abgeschätzt.

7. Quellenverzeichnis

1. Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel (Abl. L 311 S. 67), zuletzt durch die Richtlinie 2012/26/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25.10.2012 (Abl. L 299 S. 1) geändert.
2. T. Wirth, N. Parker and S. Yla-Herttuala, *Gene*, 2013, **525**, 162.
3. J. K. Lam, M. Y. Chow, Y. Zhang and S. W. Leung, *Molecular Therapy-Nucleic acids*, 2015, **4**, e252.
4. S. L. Ginn, I. E. Alexander, M. L. Edelstein, M. R. Abedi and J. Wixon, *The Journal of Gene Medicine*, 2013, **15**, 65.
5. J. K. Raty, J. T. Pikkarainen, T. Wirth and S. Yla-Herttuala, *Current Molecular Pharmacology*, 2008, **1**, 13.
6. H. Buning, *EMBO Molecular Medicine*, 2013, **5**, 1.
7. S. Yla-Herttuala, *Molecular Therapy*, 2015, **23**, 217.
8. H. Wang and A. Libby, *Orphan Drugs: Research and Reviews*, 2014, **4**, 47.
9. V. Ferreira, H. Petry and F. Salmon, *Frontiers in Immunology*, 2014, **5**, 82.
10. V. Sokolova and M. Eppele, *Angewandte Chemie*, 2008, **47**, 1382.
11. M. S. Al-Dosari and X. Gao, *The AAPS Journal*, 2009, **11**, 671.
12. H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*, Springer, Berlin, 2002.
13. T. Hofmann, *Chemie in unserer Zeit*, 2004, **38**, 24.
14. D. H. Everett, *Pure and Applied Chemistry*, 1972, **31**, 577.
15. A. Nel, T. Xia, L. Mädler and N. Li, *Science*, 2006, **311**, 622.
16. W. H. De Jong and P. J. Borm, *International Journal of Nanomedicine*, 2008, **3**, 133.
17. T. R. Sosnowski, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2015, **15**, 3476.
18. P. Kesharwani, V. Gajbhiye and N. K. Jain, *Biomaterials*, 2012, **33**, 7138.
19. D. H. Everett, *Basic principles of colloid sciences*, RSC Publishing, London, 1988.
20. Malvern-Instruments, *Zetasizer NanoSeries User Manual*, 2003.
21. H. Chang, X.-Q. Chen, C.-S. Jwo and S.-L. Chen, *Materials Transactions*, 2009, **50**, 2098.
22. S. V. Dorozhkin and M. Eppele, *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, **41**, 3130.
23. M. Eppele, *Biomaterialien und Biomineralisation*, Teubner, Wiesbaden, 2003.
24. J. Gómez-Morales, M. Iafisco, J. M. Delgado-López, S. Sarda and C. Drouet, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 2013, **59**, 1.
25. V. Uskokovic and D. P. Uskokovic, *Journal of biomedical materials research Part B: Applied biomaterials*, 2011, **96**, 152.
26. M. Eppele, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann and V. Sokolova, *Journal of Materials Chemistry*, 2010, **20**, 18.

27. F. Chen, Y. Zhu, J. Wu, P. Huang and D. Cui, *Nano Biomedicine and Engineering*, 2012, **4**, 41
28. B. Mostaghaci, B. Loretz, R. Haberkorn, G. Kickelbick and C.-M. Lehr, *Chemistry of Materials*, 2013, **25**, 3667.
29. M. Zhang and K. Kataoka, *Nano Today*, 2009, **4**, 508.
30. P. Pascaud, F. Errassifi, F. Brouillet, S. Sarda, A. Barroug, A. Legrouiri and C. Rey, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2014, **25**, 2373.
31. S. Bisht, G. Bhakta, S. Mitra and A. Maitra, *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, **288**, 157.
32. T. Boix, J. Gomez-Morales, J. Torrent-Burgues, A. Monfort, P. Puigdomenech and R. Rodriguez-Clemente, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, **99**, 1043.
33. V. Sokolova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf and M. Eppele, *Acta Biomaterialia*, 2011, **7**, 4029.
34. V. Sokolova, O. Rotan, J. Klesing, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, A. M. Westendorf and M. Eppele, *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, **14**, 1.
35. M. Okazaki, Y. Yoshida, S. Yamaguchi, M. Kaneno and J. C. Elliott, *Biomaterials*, 2001, **22**, 2459.
36. M. Banik, R. Mukherjee, M. Patra, A. K. Chatterjee, R. Chakraborty, A. P. Chattopadhyay and T. Basu, *Journal of Nanoparticle Research*, 2013, **16**, 1.
37. F. L. Graham and A. J. van der Eb, *Virology*, 1973, **52**, 456.
38. V. Sokolova, *Synthesis, Characterization and Application of Calcium Phosphate Nanoparticles for the Transfection of Cells*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2006.
39. V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann and M. Eppele, *Journal of Materials Science*, 2010, **45**, 4952.
40. T. Devarasu, R. Saad, A. Ouadi, B. Frisch, E. Robinet, P. Laquerrière, J.-C. Voegel, T. Baumert, J. Ogier and F. Meyer, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, **1**, 4692.
41. D. Kozlova, S. Chernousova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf and M. Eppele, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, **22**, 396.
42. K. Haedicke, D. Kozlova, S. Grafe, U. Teichgraber, M. Eppele and I. Hilger, *Acta Biomaterialia*, 2015, **14**, 197.
43. T. L. Doane and C. Burda, *Chemical Society Reviews*, 2012, **41**, 2885.
44. R. A. Revia and M. Zhang, *Materials Today*, 2015, (in press) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2015.08.022>.
45. Q. Chen, H. Ke, Z. Dai and Z. Liu, *Biomaterials*, 2015, **73**, 214.
46. G. Dördelmann, D. Kozlova, S. Karczewski, R. Lizio, S. Knauer and M. Eppele, *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2**, 7250.
47. G. Doerdelmann, D. Kozlova and M. Eppele, *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2**, 7123.
48. F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton and V. Preat, *Journal of Controlled Release*, 2012, **161**, 505.
49. F. Wang, Y.-C. Wang, S. Dou, M.-H. Xiong, T.-M. Sun and J. Wang, *ACS Nano*, 2011, **5**, 3679.
50. A. C. Silva, C. M. Lopes, J. M. Sousa and H. M. Amaral, *Current Drug Metabolism*, 2015, **16**, 3.

-
51. K. K. Sandhu, C. M. McIntosh, J. M. Simard, S. W. Smith and V. M. Rotello, *Bioconjugate Chemistry*, 2002, **13**, 3.
 52. D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel and C. A. Mirkin, *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, **49**, 3280.
 53. D. Brevet, O. Hocine, A. Delalande, L. Raehm, C. Charnay, P. Midoux, J.-O. Durand and C. Pichon, *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, **471**, 197.
 54. D. Luo and W. M. Saltzman, *Gene Therapy*, 2005, **13**, 585.
 55. I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu and V. S. Y. Lin, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**, 1278.
 56. V. Sokolova, A. Kovtun, R. Heumann and M. Epple, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2007, **12**, 174.
 57. V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E. A. Kubareva, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, R. Heumann and M. Epple, *Journal of Materials Chemistry*, 2007, **17**, 721.
 58. M. A. Mintzer and E. E. Simanek, *Chemical Reviews*, 2009, **109**, 259.
 59. K. Modra, S. Dai, H. Zhang, B. Shi and J. Bi, *Engineering in Life Sciences*, 2015, **15**, 489.
 60. I. Canton and G. Battaglia, *Chemical Society Reviews*, 2012, **41**, 2718.
 61. J. A. Swanson, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, **9**, 639.
 62. G. Dördelmann, *Calciumphosphat und biodegradierbare Polymere als Kompositmaterialien für Wirkstofftransport und Knochenersatz*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2015.
 63. L. Pelkmans and A. Helenius, *Traffic*, 2002, **3**, 311.
 64. J. Mercer and A. Helenius, *Nature Cell Biology*, 2009, **11**, 510.
 65. G. Sahay, D. Y. Alakhova and A. V. Kabanov, *Journal of Controlled Release*, 2010, **145**, 182.
 66. T.-G. Iversen, T. Skotland and K. Sandvig, *Nano Today*, 2011, **6**, 176.
 67. V. Mailänder and K. Landfester, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 2379.
 68. A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson, *Nature Materials*, 2009, **8**, 543.
 69. H. Kettiger, A. Schipanski, P. Wick and J. Huwyler, *International journal of Nanomedicine*, 2013, **8**, 3255.
 70. S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer and R. H. Stauber, *Nature Nanotechnology*, 2013, **8**, 772.
 71. Y. Jin, Y. Song, X. Zhu, D. Zhou, C. Chen, Z. Zhang and Y. Huang, *Biomaterials*, 2012, **33**, 1573.
 72. D. Y. Olton, J. M. Close, C. S. Sfeir and P. N. Kumta, *Biomaterials*, 2011, **32**, 7662.
 73. V. Sokolova, D. Kozlova, T. Knuschke, J. Buer, A. M. Westendorf and M. Epple, *Acta Biomaterialia*, 2013, **9**, 7527.
 74. L. Y. Chou, K. Ming and W. C. Chan, *Chemical Society Reviews*, 2011, **40**, 233.
 75. M. Toei, R. Saum and M. Forgac, *Biochemistry*, 2010, **49**, 4715.
 76. J. A. Mindell, *Annual Review of Physiology*, 2012, **74**, 69.

77. O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, **92**, 7297.
78. J.-P. Behr, *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 1997, **51**, 34.
79. R. Deng, Y. Yue, F. Jin, Y. Chen, H. F. Kung, M. C. Lin and C. Wu, *Journal of Controlled Release*, 2009, **140**, 40.
80. G. L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman and A. S. Verkman, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**, 1625.
81. A. M. Miller and D. A. Dean, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, **61**, 603.
82. D. A. Dean, *Experimental Cell Research*, 1997, **230**, 293.
83. C. M. Wiethoff and C. R. Middaugh, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, **92**, 203.
84. D. M. Dykxhoorn and J. Lieberman, *Annual Review of Medicine*, 2005, **56**, 401.
85. D. G. Sashital and J. A. Doudna, *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, **20**, 90.
86. D. H. Kim and J. J. Rossi, *Nature Reviews Genetics*, 2007, **8**, 173.
87. C. V. Pecot, G. A. Calin, R. L. Coleman, G. Lopez-Berestein and A. K. Sood, *Nature Reviews Cancer*, 2011, **11**, 59.
88. A. Frey, K. T. Giannasca, R. Weltzin, P. J. Giannasca, H. Reggio, W. I. Lencer and M. R. Neutra, *The Journal of Experimental Medicine*, 1996, **184**, 1045.
89. H. Sinnecker, T. Krause, S. Koelling, I. Lautenschlager and A. Frey, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2014, **5**, 2092.
90. A. Benninghoff and D. Drenckhahn, *Anatomie: Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*, Urban & Schwarzenberg, München, 2004.
91. M.-G. Laukoetter, *World Journal of Gastroenterology*, 2008, **14**, 401.
92. K. Murphy, P. Travers and M. Walport, *Janeway Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Wiesbaden, 2009.
93. R. Voigt, *Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2010.
94. B. Skalsky, T. Felisiak and H.-U. Petereit, *Eudragit® Application Guidelines*, Evonik Röhm GmbH, Darmstadt, 2009.
95. V. V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann and M. Epple, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3147.
96. P. A. Hassan, S. Rana and G. Verma, *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2015, **31**, 3.
97. C. Hadjicharalambous, D. Kozlova, V. Sokolova, M. Epple and M. Chatzinikolaidou, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2015, **103**, 3834.
98. M. L. Wu, S. S. Freitas, G. A. Monteiro, D. M. Prazeres and J. A. Santos, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2009, **53**, 237.
99. H. Urch, M. Vallet-Regi, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet and M. Epple, *Journal of Materials Chemistry*, 2009, **19**, 2166.
100. D. Mahl, J. Diendorf, W. Meyer-Zaika and M. Epple, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011, **377**, 386.

101. F. Meli, T. Klein, E. Buhr, C. G. Frase, G. Gleber, M. Krumrey, A. Duta, S. Duta, V. Korpelainen, R. Bellotti, G. B. Picotto, R. D. Boyd and A. Cuenat, *Measurement Science and Technology*, 2012, **23**, 1.
102. M. Banik and T. Basu, *Dalton Transactions*, 2014, 43, 3244.
103. ATCC, <http://www.lgcstandards-atcc.org/>, (aufgerufen im Oktober 2015).
104. Z. Liu, Y. Xiao, W. Chen, Y. Wang, B. Wang, G. Wang, X. Xu and R. Tang, *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2**, 3480.
105. K. Ganesan, A. Kovtun, S. Neumann, R. Heumann and M. Eppe, *Journal of Materials Chemistry*, 2008, **18**, 3655.
106. Thermo scientific Transfection Protocols Lipofectamine® 2000, <https://www.lifetechnologies.com/de/en/home/references/protocols/cell-culture/transfection-protocol/lipofectamine-2000.html>, (aufgerufen im Mai 2015).
107. K. Hakamada and J. Miyake, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, **113**, 124.
108. I. Kirchenbuechler, D. Kirchenbuechler and M. Elbaum, *Experimental cell research*, 2015, (in press) DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.11.019.
109. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 2008.
110. S. Schmitz, *Der Experimentator: Zellkultur*, Spektrum Akademischer Verlag, Wiesbaden, 2007.
111. R. L. Matz, B. Erickson, S. Vaidyanathan, J. F. Kukowska-Latallo, J. R. Baker, Jr., B. G. Orr and M. M. Banaszak Holl, *Molecular Pharmaceutics*, 2013, **10**, 1306.
112. S. Dokka, D. Toledo, X. Shi, J. Ye and Y. Rojanasakul, *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, **206**, 97.
113. M. Schnoor, I. Buers, A. Sietmann, M. F. Brodde, O. Hofnagel, H. Robenek and S. Lorkowski, *Journal of Immunological Methods*, 2009, **344**, 109.
114. H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui and J. Yan, *Journal of Controlled Release*, 2006, **114**, 100-109.
115. Marc A. Ilies, William A. Seitz, Miron T. Caproiu, M. Wentz, Robert E. Garfield and Alexandru T. Balaban, *European Journal of Organic Chemistry*, 2003, **2003**, 2645.
116. A. Paul, C.-J. Eun and J. M. Song, *Polymer*, 2014, **55**, 5178.
117. W. T. Godbey, K. K. Wu and A. G. Mikos, *Biomaterials*, 2001, **22**, 471.
118. Y. Dautova, D. Kozlova, J. N. Skepper, M. Eppe, M. D. Bootman and D. Proudfoot, *PloS one*, 2014, **9**, e97565.
119. A. E. Ewence, M. Bootman, H. L. Roderick, J. N. Skepper, G. McCarthy, M. Eppe, M. Neumann, C. M. Shanahan and D. Proudfoot, *Circulation Research*, 2008, **103**, e28.
120. M. Motskin, D. M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T. G. Gard, A. E. Porter and J. N. Skepper, *Biomaterials*, 2009, **30**, 3307.
121. R. Meena, K. K. Kesari, M. Rani and R. Paulraj, *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, **14**, 1.
122. S. Neumann, A. Kovtun, I. D. Dietzel, M. Eppe and R. Heumann, *Biomaterials*, 2009, **30**, 6794.
123. Y. C. Tseng, A. Yang and L. Huang, *Molecular Pharmaceutics*, 2013, **10**, 4391.

124. L. T. Nguyen, K. Atobe, J. M. Barichello, T. Ishida and H. Kiwada, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, **30**, 751.
125. W. J. King, N. A. Kouris, S. Choi, B. M. Ogle and W. L. Murphy, *Cell and Tissue Research*, 2012, **347**, 689.
126. A. Nakano, T. Harada, S. Morikawa and Y. Kato, *Pathology International*, 1990, **40**, 107.
127. A. Hendrickx and X. Bossuyt, *Cytometry*, 2001, **46**, 336.
128. J. A. Fulcher, M. H. Chang, S. Wang, T. Almazan, S. T. Hashimi, A. U. Eriksson, X. Wen, M. Pang, L. G. Baum, R. R. Singh and B. Lee, *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**, 26860.
129. S. Chernousova, *Calciumphosphat-Nanopartikel für die Transfektion zur Synthese biologisch aktiver Proteine und zur Gen-Stummschaltung*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2015.
130. H. Cheng and C. P. Leblond, *American Journal of Anatomy*, 1974, **141**, 537.
131. C. W. Lai, T. L. Sun, W. Lo, Z. H. Tang, S. Wu, Y. J. Chang, C. C. Wu, S. C. Yu, C. Y. Dong and L. W. Chen, *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2013, **74**, 203.
132. K. Vidal, I. Grosjean, J.-P. Revillard, C. Gespach and D. Kaiserlian, *Journal of Immunological Methods*, 1993, **166**, 63.
133. G. Decher, *Science*, 1997, **277**, 1232.
134. J. Klesing, S. Chernousova and M. Eppele, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, **22**, 199.
135. J. Klesing, *Untersuchung zur biologischen Aktivität funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2012.
136. J. Rüsing, *Calciumphosphat-Nanopartikel als Wirkstoffträger: Kolloidchemie und biomedizinische Anwendung*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2014.
137. A. A. van Apeldoorn, H.-J. van Manen, J. M. Bezemer, J. D. de Bruijn, C. A. van Blitterswijk and C. Otto, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 13226.
138. G. Romero, M. Echeverría, Y. Qiu, R. A. Murray and S. E. Moya, *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2**, 826.
139. M. Kemme, I. Prokesch and R. Heinzl-Wieland, *Polymer Testing*, 2011, **30**, 743.
140. B. S. Zolnik and D. J. Burgess, *Journal of Controlled Release*, 2008, **127**, 137.
141. F. Van Hauwermeiren, R. E. Vandenbroucke and C. Libert, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2011, **22**, 311.
142. R. E. Kontermann, P. Scheurich and K. Pfizenmaier, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2009, **4**, 279.
143. C. Mueller, *Immunology*, 2002, **105**, 1.
144. H. Wajant, K. Pfizenmaier and P. Scheurich, *Cell Death Differ*, 2003, **10**, 45.
145. C. Kriegel and M. Amiji, *Journal of Controlled Release*, 2011, **150**, 77.
146. J. McCarthy, M. J. O'Neill, L. Bourre, D. Walsh, A. Quinlan, G. Hurley, J. Ogier, F. Shanahan, S. Melgar, R. Darcy and C. M. O'Driscoll, *Journal of Controlled Release*, 2013, **168**, 28.

-
147. M. J. Hamilton, S. B. Snapper and R. S. Blumberg, *Journal of Gastroenterology*, 2012, **47**, 1.
 148. K. J. Aaltonen, L. M. Virkki, A. Malmivaara, Y. T. Konttinen, D. C. Nordstrom and M. Blom, *PloS ONE*, 2012, **7**, e30275.
 149. S. K. Williams, O. Maier, R. Fischer, R. Fairless, S. Hochmeister, A. Stojic, L. Pick, D. Haar, S. Musiol, M. K. Storch, K. Pfizenmaier and R. Diem, *PloS ONE*, 2014, **9**, e90117.
 150. K. Redlich and J. S. Smolen, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, **11**, 234.
 151. S. A. Hienz, S. Paliwal and S. Ivanovski, *Journal of Immunology Research*, 2015, **2015**, 1.
 152. S. Danese, *Gut*, 2012, **61**, 918.
 153. S. T. Rietdijk and G. R. D'Haens, *Journal of Digestive Diseases*, 2013, **14**, 282.
 154. C. Kelly, A. B. Yadav, C. Lawlor, K. Nolan, J. O'Dwyer, C. M. Greene, N. G. McElvaney, N. Sivadas, J. M. Ramsey and S. A. Cryan, *Molecular Pharmaceutics*, 2014, **11**, 4270.
 155. S. J. Lee, A. Lee, S. R. Hwang, J. S. Park, J. Jang, M. S. Huh, D. G. Jo, S. Y. Yoon, Y. Byun, S. H. Kim, I. C. Kwon, I. Youn and K. Kim, *Molecular Therapy*, 2014, **22**, 397.
 156. H. Laroui, A. L. Theiss, Y. Yan, G. Dalmasso, H. T. Nguyen, S. V. Sitaraman and D. Merlin, *Biomaterials*, 2011, **32**, 1218.
 157. B. Xiao, H. Laroui, S. Ayyadurai, E. Viennois, M. A. Charania, Y. Zhang and D. Merlin, *Biomaterials*, 2013, **34**, 7471.
 158. M. Perse and A. Cerar, *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, **2012**, 1.
 159. H. Laroui, S. A. Ingersoll, H. C. Liu, M. T. Baker, S. Ayyadurai, M. A. Charania, F. Laroui, Y. Yan, S. V. Sitaraman and D. Merlin, *PloS ONE*, 2012, **7**, e32084.
 160. A. Egesten, M. Eliasson, A. I. Olin, J. S. Erjefalt, A. Bjartell, P. Sangfelt and M. Carlson, *International Journal of Colorectal Disease*, 2007, **22**, 1421.
 161. K. Suzuki, Y. Kawauchi, S. S. Palaniyandi, P. T. Veeraveedu, M. Fujii, S. Yamagiwa, H. Yoneyama, G. D. Han, H. Kawachi, Y. Okada, Y. Ajioka, K. Watanabe, M. Hosono, H. Asakura, Y. Aoyagi and S. Narumi, *Pathology International*, 2007, **57**, 413.
 162. G. Hoermannsperger, T. Clavel, M. Hoffmann, C. Reiff, D. Kelly, G. Loh, M. Blaut, G. Holzlwimmer, M. Laschinger and D. Haller, *PloS ONE*, 2009, **4**, e4365.
 163. J. J. Kim, M. S. Shajib, M. M. Manocha and W. I. Khan, *Journal of Visualized Experiments*, 2012, **60**, e3678.
 164. C. Kriegel and M. M. Amiji, *Clinical and Translational Gastroenterology*, 2011, **2**, e2.
 165. H. Laroui, E. Viennois, B. Xiao, B. S. Canup, D. Geem, T. L. Denning and D. Merlin, *Journal of Controlled Release*, 2014, **186**, 41.
 166. J. Zhang, C. Tang and C. Yin, *Biomaterials*, 2013, **34**, 3667.
 167. L. Zuo, Z. Huang, L. Dong, L. Xu, Y. Zhu, K. Zeng, C. Zhang, J. Chen and J. Zhang, *Gut*, 2010, **59**, 470.

168. S. Schreiber, A. Dignass, H. Hartmann, W. Kruis, G. Rogler, B. Siegmund, A. Stallmach, C. Witte and B. Bokemeyer, *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2015, **53**, 591.
169. M. F. Shamji, J. Chen, A. H. Friedman, W. J. Richardson, A. Chilkoti and L. A. Setton, *Journal of Controlled Release*, 2008, **129**, 179.
170. Z. Huang, J. Gan, L. Jia, G. Guo, C. Wang, Y. Zang, Z. Ding, J. Chen, J. Zhang and L. Dong, *Biomaterials*, 2015, **48**, 26.
171. J. Carson, *Torpac Rodent Brochure*, Torpac Inc, Fairfield, 2014.
172. B. Myagmarjalbuu, M. J. Moon, S. H. Heo, S. I. Jeong, J. S. Park, J. Y. Jun, Y. Y. Jeong and H. K. Kang, *Korean Journal of Radiology*, 2013, **14**, 45.
173. S. F. Jang, B. A. Goins, W. T. Phillips, C. Santoyo, A. Rice-Ficht and J. T. McConville, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2013, **34**, 107.
174. A. M. Udager, A. Prakash, D. A. Saenz, M. Schinke, T. Moriguchi, P. Y. Jay, K. C. Lim, J. D. Engel and D. L. Gumucio, *Gastroenterology*, 2014, **146**, 157.
175. Evonik Industries, *Eudragit® L 100 ans Eudragit® S 100*, Evonik Nutrition and Care GmbH, Darmstadt 2015.
176. M. Ashford, J. T. Fell, D. Attwood and P. J. Woodhead, *International Journal of Pharmaceutics*, 1993, **91**, 241-245.
177. D. F. Evans, G. Pye, R. Bramley, A. G. Clark, T. J. Dyson and J. D. Hardcastle, *Gut*, 1988, **29**, 1035.
178. W. Wang, *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, **203**, 1.
179. W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse and H. Fessi, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, **58**, 1688.
180. S. Nath, *Size 9 Enteric Coated Capsules Test Method*, Torpac Inc, Fairfield, 2011.
181. Sigma-Aldrich, *Sicherheitsdatenblatt Poly(methyl methacrylate)*, Sigma-Aldrich, Steinheim, 2015.
182. K. M. de Lange and J. C. Barrett, *Journal of Autoimmunity*, 2015, **64**, 91.
183. J. Luo, J. Cao, X. Jiang and H. Cui, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2010, **64**, 441.
184. Q. Zhu, J. Talton, G. Zhang, T. Cunningham, Z. Wang, R. C. Waters, J. Kirk, B. Eppler, D. M. Klinman, Y. Sui, S. Gagnon, I. M. Belyakov, R. J. Mumper and J. A. Berzofsky, *Nature Medicine*, 2012, **18**, 1291.
185. M. A. Benoit, B. Baras and J. Gillard, *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, **184**, 73.
186. M. D. Bhavsar and M. M. Amiji, *AAPS PharmSciTech*, 2008, **9**, 288.
187. M. D. Bhavsar, S. B. Tiwari and M. M. Amiji, *Journal of Controlled Release*, 2006, **110**, 422.
188. D. S. Wilson, G. Dalmasso, L. Wang, S. V. Sitaraman, D. Merlin and N. Murthy, *Nature Materials*, 2010, **9**, 923.
189. B. J. Berne and R. Pecora, *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*, Wiley, New York, 1976.
190. M. Hasselov, J. W. Readman, J. F. Ranville and K. Tiede, *Ecotoxicology*, 2008, **17**, 344.
191. FEI, *An Introduction to Electron Microscopy*, FEI, Hillsboro 2010.
192. J. I. Goldstein, A. D. Romig, D. E. Newbury, C. E. Lyman, P. Echlin, C. Fiori, D. C. Joy and E. Lifshin, *Scanning electron microscopy and X-ray*

-
- microanalysis: a Text for Biologists, Materials Scientists, and Geologists*, Plenum Press, New York, 1992.
193. J. Ohnsorge and R. Holm, *Rasterelektronenmikroskopie: eine Einführung für Mediziner und Biologen*, Thieme, Stuttgart, 1978.
 194. A. Hauk, *Biologie in unserer Zeit*, 2013, **43**, 278.
 195. S. Bhat, N. Curach, T. Mostyn, G. S. Bains, K. R. Griffiths and K. R. Emslie, *Analytical Chemistry*, 2010, **82**, 7185.
 196. M. Hesse, H. Meier and B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, 2005.
 197. M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2008.
 198. R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis and H. Erlich, *Science*, 1988, **239**, 487.
 199. I. M. Mackay, *Real Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*, Caister Academic Press, Norfolk, 2007.
 200. S. A. Bustin, *A - Z of Quantitative PCR*, International University Line, La Jolla, 2009.
 201. E. M. Goldys, *Fluorescence Applications in Biotechnology and Life Sciences*, Wiley-Blackwell, Hoboken, 2009.
 202. T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods*, 1983, **65**, 55.
 203. M. V. Berridge and A. S. Tan, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993, **303**, 474.
 204. C. Mülhardt, *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*, Springer Spektrum, Berlin, 2013.
 205. H. Fraenkel-Conrat and H. S. Olcott, *Journal of the American Chemical Society*, 1948, **70**, 2673.
 206. Y. Matsuda, T. Fujii, T. Suzuki, K. Yamahatsu, K. Kawahara, K. Teduka, Y. Kawamoto, T. Yamamoto, T. Ishiwata and Z. Naito, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2011, **59**, 68.
 207. Life technologies, *Cell Mask™ Plasma Membrane Stains*, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, 2014.
 208. S. Hamada and S. Fujita, *Histochemistry*, 1983, **79**, 219.

8. Anhang

8.1 Liste der verwendete Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Ac-BSA	Acetyliertes bovines Serum Albumin
Ago2	Argonautenprotein 2
BSA	Bovines Serum Albumin
CaP	Calciumphosphat
CCV	<i>Clathrin coated vesicles</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EA	Elementaranalyse
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FACS	<i>Fluorescence assisted cell sorting;</i> Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FBS	fötales Rinderserum
GS	Genstummschaltung
HAP	Hydroxylapatit
HeLa	Henrietta Lacks
IBD	<i>inflammatory bowel diseases</i>
kDa	Kilodalton
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M_w	mittlere Molmasse (Gewichtsmittel)
NF κ B	<i>nuclear factor κ-light chain enhancer of activated B-cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
pDNA	Plasmid-DNA
PEI	Polyethylenimin
PLGA	Poly(<i>D,L</i> -lactic-co-glycolic acid)
PMMA	Polymethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVA	Polyvinylalkohol
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RLC	<i>RISC-loading complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TE	Transfektionseffizienz
THPP	5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)-porphyrin
UV	Ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
VSMCs	<i>vascular smooth muscle cells</i>

8.2 Liste der verwendeten Geräte

Atomabsorptionsspektrometer	Thermo Electron, M-Serie
Dynamische Lichtstreuung	Malvern, Zetasizer Nano ZS
FACS	Becton Dickinson, FACS LSR II Becton Dickinson, FACS Aria II
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiovert 40 CFL Keyence BZ900
Gefriertrocknungsanlage	Christ, Alpha 2-4 LSC
<i>Multi-Plate Reader</i>	Multiscan FC, ThermoFisher scientific, Vantaa, Finnland
qPCR	Applied Biosystems, 7500 Fast Real-Time System
Rasterelektronenmikroskop	FEI, Quanta 400 FEG
Reinstwasseranlage	Elga, Purelab Ultra Bioscience
Ultraschalldispenser	Hielscher, UP50 H
Ultrazentrifuge	Thermo Scientific, SORVALL WX Ultra Series
UV-Vis-Spektrometer	Varian, Cary 300 Bio
Zellkulturbank	Thermo Scientific, MSC Advantage
Zentrifuge	ThermoFisher scientific, Hereaus Fresco 21

8.3 Liste der verwendeten Chemikalien

Name	Hersteller	Bemerkung
Ac-BSA	Promega	
Aceton	Bernd Kraft	
Ammoniak	Roth	30 %, p.a.
Calcium <i>L</i> -lactat Pentahydrat	Fluka	p.a.
CellMask®	Life Technologies	
DAPI Dilactat	Invitrogen	
DEPC	Sigma-Aldrich	
Diammoniumhydrogen- phosphat	Fluka	p.a.
Dichlormethan	Fisher Scientific	
DMEM; α -MEM; RPMI	Life Technologies	
DMSO	Applichem	$\geq 99,5 \%$
DNA	Sigma-Aldrich	Fragmentierte (<50 BP) Heringssperma DNA
DNA	Macherey-Nagel	pcDNA3-eGFP $M_w=3\,621\,600\text{ g mol}^{-1}$
D-(+)-Trehalose-di- Hydrat	Sigma-Aldrich	
Ethanol	VWR	99,8 %
Eudragit L100	Evonik Industries	$M_w=125\,000\text{ g mol}^{-1}$
FCS	Life Technologies	
Geneticin	Life Technologies	
Lipofectamine®	Invitrogen	
M-MLV- (H-) reverse Transkriptase	Promega	Enzym
Fluorescent Mounting Medium	Dako	
MPS	Sigma-Aldrich	
MTT	Life Technologies	

Name	Hersteller	Bemerkung
Oligonukleotide	Life Technologies	5' markiert mit AlexaFluor®-647
PBS	Life Technologies	
Polyethylenimin verzweigt	Aldrich	25 kDa
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich	30-70 kDa, 87-90% hydrolysiert
P/S	Life Technologies	
RESOMER RG 502H	Evonik Industries	$M_w=7000-17000 \text{ g mol}^{-1}$
TEOS	Sigma-Aldrich	
Trypsin-EDTA	Life Technologies	
siRNA	Invitrogen	
siRNA	Dharmacon GE HealthCare Life Sciences	

8.4 Publikationsliste

Publikationen in referierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften

B. Neuhaus, B. Tosun, O. Rotan, A. Frede, A.M. Westendorf, M. Epple, "The susceptibility of different cell lines to transfection with nanoparticles and liposomes is correlated with the cytotoxic effect of the transfection agent", **RSC Advances** **6** (2016) 18102-18112

A. Frede, B. Neuhaus, R. Klopffleisch, C. Walker, J. Buer, W. Müller, M. Epple, A.M. Westendorf, "Colonic gene silencing using siRNA-loaded calcium phosphate/PLGA nanoparticles ameliorates intestinal inflammation in vivo", **Journal of Controlled Release** **222** (2016) 86-96

B. Neuhaus, A. Frede, A.M. Westendorf, M. Epple, "Gene silencing of the pro-inflammatory cytokine TNF- α with calcium phosphate nanoparticles", **Journal of Materials Chemistry B** **3** (2015) 7186-7193.

Sonstige Publikationen

B. Neuhaus, O. Rotan, B. Tosun M. Eppe, "Die Transfizierbarkeit unterschiedlicher Zelltypen mit Nanopartikeln", **BioNanoMaterials 16** (2015) 189.

B. Neuhaus, M. Eppe, A. Frede, A. Westendorf, "Ein Vergleich der Genstummschaltungseffizienz unterschiedlicher nanopartikulärer Systeme", **BioNanoMaterials 15** (2014) S80.

B. Neuhaus, M. Eppe, A. Frede, A.M. Westendorf, "Encapsulation of biofunctionalized calcium phosphate nanoparticles into polymers for passage through the stomach into the gut", **BioNanoMaterials 14** (2013) 162.

Wissenschaftliche Vorträge (P=Poster; V=Vortrag)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Freiburg i. Br., 12.-14.11.2015, B. Neuhaus, O. Rotan, B. Tosun M. Eppe, "Die Transfizierbarkeit unterschiedlicher Zelltypen mit Nanopartikeln" (**P**)

CRC 1093 International Symposium 2015: Supramolecular Chemistry on Proteins, Essen 29.-30.09.2015, B. Neuhaus, R. Verhaegh, H. de Groot, M. Eppe, "Calcium phosphate nanoparticles as drug carriers across the intestinal barrier" (**P**)

27th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Krakau, Polen, 30.08.-03.09.2015, B. Neuhaus, A. Frede, A. Westendorf, M. Eppe, "Regulation of inflammatory gene expression by functionalized calcium phosphate nanoparticles with different delivery strategies to the gut" (**V/P**)

International Conference on Mucosal Immunology, Berlin, 14.-18.07.2015, A. Frede, B. Neuhaus, M. Eppe, A.M. Westendorf, "Modulation of intestinal inflammatory processes by specific knockdown of cytokines with siRNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles" (**P**)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mukosale Immunologie und Mikrobiom, Essen, 14.-15. November 2014, A. Frede, B. Neuhaus, M. Eppe, A.M. Westendorf, „Specific knockdown of inflammatory mediators by siRNA-functionlized calcium phosphate nanoparticles during intestinal inflammation“

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Dresden, 06.-08.11.2014, B. Neuhaus, M. Eppe, A. Frede, A. Westendorf, "Ein Vergleich der Genstummschaltungseffizienz unterschiedlicher nanopartikulärer Systeme" (**P**)

4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Bonn, 17.-20.09.2014, A. Frede, B. Neuhaus, M. Eppe, A.M. Westendorf, "Selective knockdown of inflammatory mediators by siRNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles during intestinal inflammation" (**P**)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Erlangen, 26.-28.09.2013, B. Neuhaus, M. Eppe, A. Frede, A.M. Westendorf, "Encapsulation of biofunctionalized calcium phosphate nanoparticles into polymers for passage through the stomach into the gut" (**P**)

8.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes nicht in dieser Version enthalten.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel als Instrument zum
Eingriff in die Proteinbiosynthese und deren therapeutische Anwendung“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Dezember 2015

Bernhard Neuhaus

10. Danksagung

Ich bedanke mich...

bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Matthias Eppe für die interessante und interdisziplinäre Aufgabenstellung. Außerdem bedanke ich mich für die gute Betreuung und Unterstützung, sowie die gewährten Freiräume während der Bearbeitung meines Promotionsthemas. Nicht zuletzt möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Forschungsergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen vorzustellen, sowie die Gelegenheit Forschungsthemen während verschiedener Auslandsaufenthalte zu bearbeiten.

bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Astrid Westendorf für die Begutachtung der Dissertation als Zweitgutachterin. Außerdem möchte ich mich für die gute Kooperation, die Möglichkeit zur Nutzung der qPCR und des FACS, die Diskussionsbereitschaft und Denkanstöße während der Promotionsphase bedanken.

bei Annika Frede für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Kooperationsprojektes. Weiterhin bedanke ich mich für die FACS-Messungen und die Unterstützung bei der qPCR, sowie die schnelle Durchsicht von Teilen dieser Arbeit.

bei Benjamin Tosun für die stets motivierte Mitarbeit und die guten Ergebnisse im Rahmen seines Praktikums.

bei Kerstin Brauner, Veronika Hiltenkamp und Robin Meya für die Bestimmung des Calciumgehaltes meiner Proben.

bei Kateryna Loza für die unzähligen REM-Bilder, sowie die vielen Kaffeepausen und Diskussionen.

10. Danksagung

bei Carola Fischer, Sabine Kiefer und Sabine Bollmann für die Unterstützung bei den vielen administrativen Dingen.

bei Carola Fischer außerdem für die schnelle und unkomplizierte Anfertigung der Werkstücke für die Zäpfchenherstellung und Kapselbeschichtung.

bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des AK Epple für die gute Zusammenarbeit, Kaffeepausen, Diskussionen und Unterstützung im Laboralltag.

bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die bedingungslose Unterstützung während des gesamten Studiums.

bei Marie für die Aufmunterung während der anstrengenden Zeiten und das gemeinsame Genießen der angenehmeren Zeiten.